

UNTERSUCHUNGEN DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN VON 125 JODOCYANOPINDOLOL
AN β -ADRENOZEPTOREN MENSCHLICHER LYMPHOZYTEN UND DEREN
MODIFIKATION DURCH DITHIOTHREITOL UND ANDERE THIOLVERBINDUNGEN

Bernhard Liebl

Disbui. München

1988



Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Professor Dr. med. W. Forth

Untersuchungen der Bindungseigenschaften von ¹²⁵Jodocyanopindolol
an β -Adrenozeptoren menschlicher Lymphozyten und deren
Modifikation durch Dithiothreitol und andere Thiolverbindungen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bernhard Liebl
aus München
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Remien

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. W. Forth
Priv. Doz. Dr. med. A. Schalhorn

Dekan: Prof. Dr. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.1987

1. Einleitung

2. Einleitung

3. Das Vermächtnisrecht

4. Das Vermächtnisrecht

5. Vermächtnis und Erbschaft

Meinen Eltern gewidmet

6. Vermächtnis

7. Vermächtnis und Erbschaft

8. Vermächtnis und Erbschaft

9. Vermächtnis und Erbschaft

10. Vermächtnis und Erbschaft

11. Vermächtnis und Erbschaft

12. Vermächtnis und Erbschaft

13. Vermächtnis und Erbschaft

14. Vermächtnis und Erbschaft

15. Vermächtnis und Erbschaft

16. Vermächtnis und Erbschaft

17. Vermächtnis und Erbschaft

18. Vermächtnis und Erbschaft

19. Vermächtnis und Erbschaft

20. Vermächtnis und Erbschaft

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>A. EINLEITUNG</u>	1
1. Allgemeines	1
2. Das Adenylatzyklase-System	3
3. Ziel dieser Arbeit	7
<u>B. MATERIAL UND METHODEN</u>	9
1. Material	9
2. Isolierung der Lymphozyten aus menschlichem Blut	12
3. Untersuchung der Zellsuspension	15
3.1. Zählung der Zellen	16
3.2. Testung der Vitalität der Zellen	16
4. Erzeugung von Lymphozytenmembranen	16
5. Sättigungsexperimente	17
5.1. Theoretische Grundlagen	17
5.1.1. Die Sättigungskurve	17
5.1.2. Der Scatchard-Plot	21
5.1.3. Spezifische und unspezifische Bindung	23
5.1.4. Trennung des gebundenen vom freien Liganden	25
5.2. Sättigungsexperimente mit $(-)^{125}$ Jodocyanopindolol an Lymphozyten und deren Beeinflussung durch Dithiothreitol	26

6. Dosis-Wirkungsbeziehung des Effekts von Thiolen auf die spezifische Bindung von (-)- ¹²⁵ Jodocyanopindolol an Lymphozyten	28
7. Dissoziationskinetiken	29
7.1. Theoretische Grundlagen	29
7.2. Dissoziationskinetik für (-)- ¹²⁵ Jodocyanopindolol und deren Beeinflussung durch Dithiothreitol	33
8. Untersuchung des Einflusses von Dithiothreitol auf den intrazellulären cAMP-Spiegel	36
9. Datenverarbeitung und statistische Auswertung	37
<u>C. ERGEBNISSE</u>	39
1. Dosis-Wirkungsbeziehung des Effekts von Thiolen auf die spezifische Bindung von (-)- ¹²⁵ Jodocyanopindolol an Lymphozyten	39
2. Vitalität der Zellen unter dem Einfluß von Dithiothreitol	47
3. Einfluß von Dithiothreitol auf Sättigungsexperimente mit (-)- ¹²⁵ Jodocyanopindolol an menschlichen Lymphozyten	48
4. Einfluß von Dithiothreitol auf die Dissoziation von (-)- ¹²⁵ Jodocyanopindolol von menschlichen Lymphozyten	55
5. Einfluß von Dithiothreitol auf den intrazellulären cAMP-Spiegel	56

D. DISKUSSION

60

1. Hoch- und niederaffine Bindungsstellen für (-)¹²⁵Jodocyanopindolol auf menschlichen Lymphozyten 60
2. Einfluß von Dithiothreitol auf die Bindung von (-)¹²⁵Jodocyanopindolol an β -Adrenozeptoren auf Lymphozyten 63

E. ZUSAMMENFASSUNG

73

F. LITERATURVERZEICHNIS

74

A. EINLEITUNG

1. Allgemeines

Paul Ehrlich (25) und John N. Langley (42) entwickelten Anfang dieses Jahrhunderts die Vorstellung, daß endogene Mediatoren (Hormone, Transmitter) ebenso wie verschiedene Pharmaka spezifisch an bestimmte Zellstrukturen (Makromoleküle der Zellmembran) binden und infolge dieser Bindung ihre spezifische Wirkung auslösen. Später wurde für diese Gruppe spezifischer Bindungsorte der Begriff Rezeptor eingeführt (25).

Wegen der Spezifität zueinander wird das System aus Rezeptor und Mediator häufig mit Schloß und Schlüssel verglichen. Im Bereich der Erforschung der biochemisch-physiologischen Wirkung von Hormonen und Neurotransmittern wurde eine Vielzahl derartiger Systeme entdeckt.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Funktion des β -Adrenozeptors des sympathikoadrenergen Systems.

Die von J.N. Langley (42,43,44) beschriebene sympathikoadrenerge Regulation ist Teil eines kybernetischen Systems zur Anpassung der Einzelzelle an die Erfordernisse des Gesamtorganismus. Die physiologischen Vermittler dieses Systems sind Noradrenalin, das überwiegend als Neurotransmitter in den postganglionären Synapsen des sympathischen Nervensystems freigesetzt wird, und Adrenalin, das als im Blut zirkulierendes Hormon hauptsächlich im Nebennierenmark gebildet und freigesetzt wird. Diese beiden Stoffe sind die endogenen Mediatoren der adrenergen Rezeptoren.

Identifikation und Analyse ihrer chemischen Struktur machten es möglich, den endogenen Mediatoren Adrenalin und Noradrenalin chemisch verwandte Stoffe (Pharmaka) zu synthetisieren, die in gleicher Weise wie diese wirken, so z.B. Isoprenalin. Allgemein nennt man die Substanzen, die an Membranrezeptoren binden und zu einem spezifischen physiologischen Effekt führen, Agonisten.

Im Gegensatz dazu gibt es auch Liganden, die zwar mit hoher Spezifität an den Rezeptor binden, jedoch ohne eine derartige Wirkung zu haben. Diese Stoffe nennt man Antagonisten.

Allgemein bezeichnet man Stoffe, die mit hoher Spezifität an Membranrezeptoren binden (Agonisten und Antagonisten) als deren Liganden.

Eine Klassifizierung der adrenergen Rezeptoren erfolgte durch Ahlquist (3), der 1948 α - und β -Adrenorezeptoren unterschied. 1967 zeigten Lands et al. (40,41), daß auch die Population der β -Adrenorezeptoren nicht einheitlich ist. Aufgrund ihrer Ergebnisse erfolgte eine weitere Unterteilung dieser Rezeptoren in β_1 - und β_2 -Adrenorezeptoren.

1974 gelang durch die Einführung radioaktiv markierter hochaffiner β -adrenerger Antagonisten (6,7,45) erstmals der biochemische Nachweis von β -Adrenorezeptoren. Seitdem konnten die β -Adrenorezeptoren in sog. Radioligand-Bindungsstudien weiter charakterisiert werden. Dabei häufig verwendete Radioliganden sind: ^3H -Dihydroalprenolol (^3H -DHA), ^{125}I -Hydroxybenzylpindolol (^{125}I -JHYP) und ^{125}I -Jodocyanopindolol (^{125}I -JCYP).

Pindolol und seine Derivate bewirken keine Stimulierung der Adenylatzyklase (20), und verhalten sich, wie thermodynamische Untersuchungen zeigten, auch bezüglich ihrer Bindung an β -Adrenorezeptoren wie Antagonisten (20,21), weshalb sie in diesem Zusammenhang auch als Antagonisten bezeichnet werden. Andererseits wird in einigen Arbeiten von einer intrinsischen sympathomimetischen Aktivität durch Pindolol berichtet (17,35,36). Wie diese Effekte entstehen ist noch unklar.

Mittels dieser radioaktiv markierten Liganden konnte an den verschiedensten Organen und Zellen unterschiedlicher Spezies β -Adrenorezeptoren identifiziert und charakterisiert werden: so z.B. an Lunge, Herz, Gehirn und Niere der Ratte (4,12,62), Meerschweinchenlunge (26), Herz- und Skelettmuskelzellen des Kanninchens (56,74), Truthahnerythrozyten (6,7,46,69), Rattenretikulozyten

(55), Rattenlymphozyten (62), Zellkulturen von S49-Lymphomzellen (33,50), sowie an menschlichen Granulozyten (24,30) und Lymphozyten (13,38,54,57,73).

2. Das Adenylatzyklase-System

Der β -Adrenozeptor ist Bestandteil einer allgemeinen Informationsübertragungskette an der Zellmembran. Dieses System, das den Informationsfluß über die Plasmamembran vermittelt, besteht aus drei verschiedenen Typen von Membranproteinen:

1. Rezeptorproteine

2. Guanylnucleotid-bindende Proteine, auch G- oder N-Proteine genannt. Man bezeichnet diese Gruppe von Proteinen auch als Kopplungs- oder Regulatorproteine.

3. Adenylatzyklase

Bindet ein Agonist ("first messenger") an ein Rezeptorprotein, so interagiert dieses mit einem G-Protein, welches seinerseits mit dem Enzym Adenylatzyklase in Wechselwirkung tritt. Diese Wechselwirkung kann sowohl zu dessen Aktivierung als auch Inaktivierung führen. Die Aktivierung der Adenylatzyklase bewirkt den Umsatz von ATP (Adenosintriphosphat) zum "second messenger" cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und somit zu dessen Bereitstellung im Zytoplasma. Dort steuert das cAMP verschiedene Proteinkinasen, die ihrerseits bestimmte Schlüsselenzyme des Zellstoffwechsels kontrollieren.

Eine genauere Untersuchung der Bestandteile des Informationsübertragungssystems an der Zellmembran wurde durch die Isolierung und Reinigung der daran beteiligten Membranproteine möglich:

Am meisten weiß man über die Rezeptorproteine, da sie an der Zelloberfläche gelegen, relativ leicht zugänglich sind und über die Bindung spezifischer Liganden markiert werden können. Vor



kurzem gelang einer amerikanischen Arbeitsgruppe die Totalanalyse der Aminosäuresequenz des β -Adrenozeptors (23).

Der Aufbau der G-Proteine konnte vor allem durch eine Arbeitsgruppe um Gilman (31) genauer analysiert werden. Danach existieren bezüglich des Adenylatzyklase-Systems zwei antagonistische Arten von G-Proteinen: Das G_s - (oder N_s -)Protein, das die Adenylatzyklase zu stimulieren vermag, und das G_i (oder N_i -)Protein, welches die Adenylatzyklase inhibiert. G_s - und G_i -Proteine bestehen jeweils aus drei Untereinheiten, einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit. Von dominanter Bedeutung ist dabei die α -Untereinheit. Sie besitzt die Bindungsstelle für Guanylnucleotide. Außerdem enthält sie Bindungsregionen für eine Ankopplung sowohl an den Rezeptor als auch an die Adenylatzyklase.

Von der Struktur und den Eigenschaften der hochmolekularen Bestandteile des Informationsübertragungssystems ist aufgrund ihrer biochemischen Instabilität am wenigsten die Adenylatzyklase erforscht. Sie kann im Gegensatz zum Betarezeptor und den G-Proteinen derzeit noch nicht molekular dargestellt werden (67).

Durch sogenannte Rekonstitutionsexperimente konnte das Adenylatzyklase-System noch detaillierter untersucht werden. Dabei erfolgt die Rekonstitution isolierter und gereinigter Rezeptor- und/oder G-Proteine in geeigneten Lipidmembranen (Liposomen), wodurch diese in der nativen Form stabilisiert werden können. Aufgrund der bislang vorliegenden Ergebnisse konnte folgende Vorstellung zur Signalübertragung von Rezeptoren auf die Adenylatzyklase erarbeitet werden (9,11,16,18,64):

Die Bindung eines Agonisten führt zur Aktivierung des Rezeptors und bedingt die Ausbildung eines Komplexes zwischen dem Rezeptor und dem G-Protein. Man bezeichnet diesen Vorgang auch als "Coupling" (=Ankopplung des Rezeptors an die Rezeptorbindungsregion der α -Untereinheit des G-Proteins). Der Komplex aus Ligand, Rezeptor- und G-Protein wird von einigen Autoren auch "ternary complex" genannt (2,22,32,59).

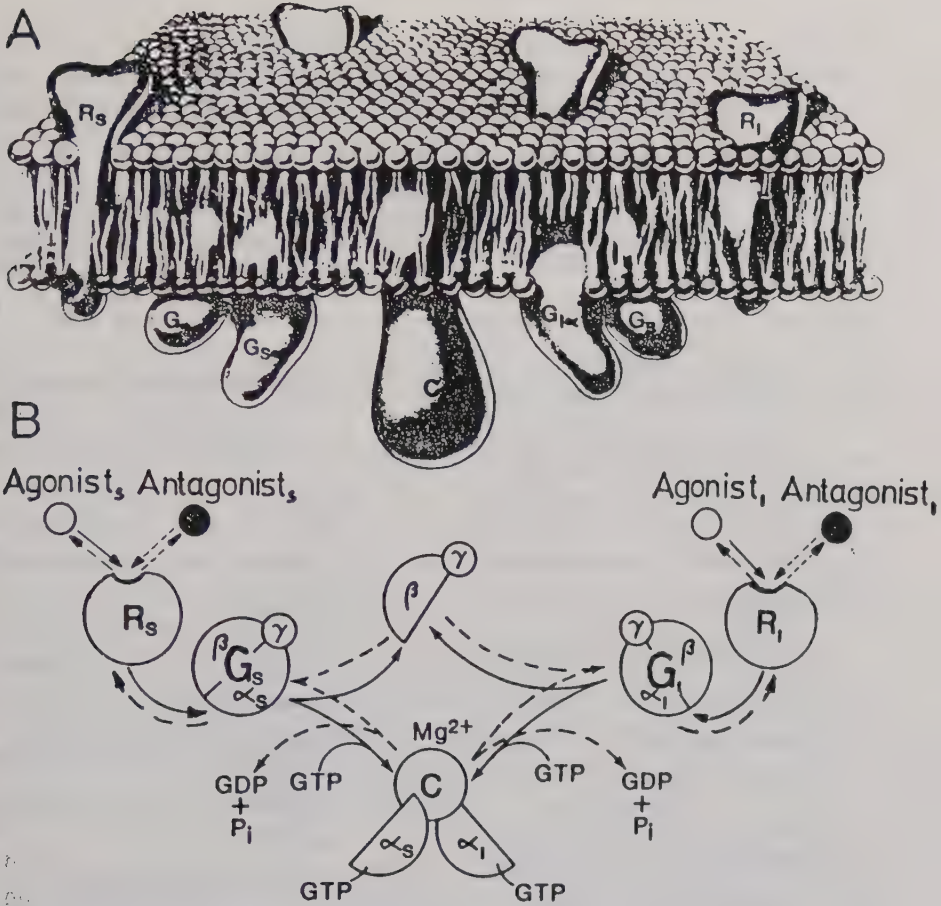


Abb. 1. Das Rezeptor-Adenylatzyklase-System. A: Bestandteile der Informationsübertragungskette an der Zellmembran: Rezeptorprotein (R_s bzw. R_i), Guanidnucleotid-bindendes Protein (G_s bzw. G_i) und die Adenylatzyklase (C) (31). B: Schematisches Modell des Informationsflusses über dieses System: Bindung eines Agonisten führt zur Rezeptoraktivierung. Dadurch kommt es zur Kopplung des Rezeptors an die α -Untereinheit des G-Proteins, das dabei stimuliert wird und GTP bindet. Gleichzeitig zerfällt das G-Protein in eine $\beta\gamma$ - und die aktivierte α -Untereinheit, die die Adenylatzyklase stimuliert (α_s) oder inhibiert (α_i) (9). Antagonisten vermögen wie die Agonisten an die Membranrezeptoren zu binden, ohne jedoch die weiteren Schritte der Informationsübertragung herbeizuführen. Sie verhindern den spezifischen physiologischen Effekt der Agonisten durch ihre Besetzung der Rezeptoren.

Tab. 1. Zusammenstellung endogener Stimulatoren und Inhibitoren der Adenylatzyklase (9,58): Dabei ist zu beachten, daß die angegebenen Mediatoren und deren Rezeptoren dieses System mehr oder weniger stark aktivieren bzw. hemmen. Es handelt sich beim Adenylatzyklase-System lediglich um einen Teilaspekt aus einer Reihe verschiedener Signalweiterleitungssysteme. Je nach Mediator spielen auch andere Systeme, wie z.B. das Ca^{2+} -System oder das Phosphoinositid-System eine mehr oder weniger entscheidende Rolle bei der Signalweiterleitung.

Adenylatzyklase-Stimulierung	Adenylatzyklase-Hemmung
Noradrenalin/Adrenalin (β_1 - und β_2 -Rezeptoren)	Noradrenalin (α_2 -Rezeptor)
Dopamin (D_1 -Rezeptor)	Dopamin (D_2 -Rezeptor)
Histamin (H_2 -Rezeptor)	Acetylcholin (M_2 -Rezeptor)
Adenosin (A_2 -Rezeptor)	Adenosin (A_1 -Rezeptor)
Vasopressin (V_2 -Rezeptor)	Vasopressin (V_1 -Rezeptor)
Glukagon	Insulin
Parathormon	Opioidpeptide (Endorphine)
Calcitonin	Angiotensin II
Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP, Sekretin)	Somatostatin
Bradykinin	GABA (GABA_A -Rezeptor)
Prostaglandine (PGE_1 , PGE_2 , PGI_2)	
hypothalamische "releasing factors"	
ACTH	
TSH	
MSH	
FSH, LH	

Dies hat eine Aktivierung der α - Untereinheit zur Folge, die dabei eine hohe Affinität gegenüber GTP (Guanosintriphosphat) erhält, worauf GTP im Austausch gegen GDP (Guanosindiphosphat) an das Protein gebunden wird. Parallel dazu zerfällt das G-Protein, die β - und γ -Untereinheiten lösen sich von der α -Untereinheit. Anschließend löst sich die aktivierte α -Untereinheit vom Rezeptor (=Abkopplung oder "uncoupling") und tritt mit der Adenylatzyklase in Wechselwirkung.

Je nach Art des Agonisten und seines Rezeptors kommt es durch die eben beschriebene Reaktionsfolge zur Aktivierung eines G_s - bzw. eines G_i -Proteins und damit zur Entstehung einer aktivierten α_s - bzw. α_i -Untereinheit. α_s bewirkt dann eine Aktivitätssteigerung der Adenylatzyklase, während α_i eine Aktivitätsminderung der Adenylatzyklase zur Folge hat. Die Inaktivierung dieses Systems erfolgt möglicherweise über eine GTP-Spaltung durch die α -Untereinheit selbst (sie verfügt über eine GTP-ase Aktivität). Dabei entsteht das sich am Ausgangspunkt der Reaktionskette befindliche inaktive G-Protein mit einer GDP-bindenden α -Untereinheit.

Abbildung 1 faßt die gegenwärtigen Vorstellungen zur Signalübertragung von Rezeptoren auf die Adenylatzyklase zusammen. Tabelle 1 enthält eine Zusammenstellung endogener Hormone und Neurotransmitter, die wahrscheinlich die Adenylatzyklase mittels des eben beschriebenen Mechanismus stimulieren bzw. hemmen.

Es handelt sich beim Betarezeptor um einen Rezeptortyp, der über die Adenylatzyklase stimulierende G_s -Kopplungsproteine wirkt. Die Bindung von Agonisten an den Betarezeptor führt also zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und letztlich zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels.

3. Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden Bindungsstudien mit dem radioaktiv markierten β -adrenergen Antagonisten 125 IJCYP an menschlichen Lymphozyten durchgeführt. Man ging dabei bisher von einer einheitlichen

Klasse von Bindungsstellen für diesen Radioliganden aus (14, 28, 37, 39). Jüngste Ergebnisse aus unserem Labor widerlegen jedoch diese Annahme und weisen auf eine heterogene Bindungsstellenpopulation hin (5).

Von großer Wichtigkeit ist nun die Bewertung dieser Heterogenität bezüglich ihrer biologischen Bedeutung. Bislang konnten lediglich für β -adrenerge Agonisten verschiedene funktionell wichtige Rezeptorbindungszustände nachgewiesen werden, nämlich hoch- und niederaffine Rezeptorbindung (9, 20). Wir stellten uns daher folgende Frage: Welche Zusammenhänge gibt es zwischen unseren Daten aus Bindungsstudien mit dem Antagonisten $^{125}\text{JCYP}$ und den bisherigen Erkenntnissen über das für die Ausbildung biologischer Effekte entscheidende Signalweiterleitungssystem, das ja nur durch Agonistenbindung an die Rezeptoren aktiviert werden kann?

In dieser Frage ergab sich ein experimenteller Zugang aus einigen Arbeiten mit der Disulfidbrücken spaltenden Thiolverbindung Dithiothreitol (DTT), die auf die Existenz einer funktionell wichtigen Disulfidbrücke am β -Adrenozeptorprotein hinweisen (53, 69, 70). Deshalb sollte in dieser Arbeit der Einfluß von DTT und anderen Thiolen sowohl auf die Bindung unseres Radioliganden als auch auf einen funktionellen Parameter, den intrazellulären cAMP-Spiegel, untersucht werden. Dazu wurde der Einfluß der Thiole anhand verschiedener Versuchsaufbauten analysiert:

1. Dosis-Wirkungsbeziehungen: Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit eines möglichen Effekts von Thiolen auf die Bindung von $^{125}\text{JCYP}$ an menschliche Lymphozyten.
2. Sättigungsexperimente: Zur Erforschung möglicher Veränderungen der Affinität oder Bindungsstellendichte des Radioliganden.
3. Dissoziationskinetiken: Zur Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der Dissoziation des Radioliganden.
4. Intrazellulärer cAMP-Spiegel: Der "second messenger" des in Abschnitt A.2. besprochenen Informationsübertragungssystems an der Zellmembran wurde unter dem Einfluß von DTT gemessen.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

Puffer:

HH-Puffer: Hepes gepufferte Salzlösung nach Hank

Salzlösung nach Hank: Die verwendeten Salze waren von analytischer Reinheit und wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen. Zusammensetzung:

	mg/l	mmol/l
Kalziumchlorid (CaCl_2)	185.5	1.26
Kaliumchlorid (KCl)	400.0	5.40
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	60.0	0.44
Magnesiumphosphat (MgSO_4)	200.0	0.80
Natriumchlorid (NaCl)	8000.0	136.90
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	60.0	0.42
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	350.0	4.30

Hepes: Hersteller: Sigma Chemical Company, St. Louis, USA

Zusammensetzung: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonäure ($\text{pK}_a=7.5$) 5800.0 mg/l (25.00 mmol/l)

TRIS-Puffer: Tris/HCl gepufferte Magnesiumchloridlösung

Zusammensetzung:

	mg/l	mmol/l
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	4810.0	40.00
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	4060.0	20.00

(Hersteller: Fa. Merck, Darmstadt)

Die Pufferlösungen wurden in Aqua tridest. (Millipore®) angesetzt. Dem HH-Puffer wurde zusätzlich als Indikator Phenolrot (10 mg/l) zugesetzt. Der pH-Wert der Pufferlösungen wurde mit Hilfe

einer geeichten Glaselektrode durch Zugabe von HCl bzw. NaOH auf pH 7.4 eingestellt.

Chemikalien:

EDTA: Ethylendiaminotetraessigsäure Dinatriumsalz (Titriplex[®] III). Hersteller: Fa. Merck, Darmstadt

Lymphopaque: Hersteller: Nyegard & Co., Oslo, Norwegen. Zusammensetzung: Sodium Metrizoat und eine Mischung verschiedener Polydextrane (zur Gradientenzentrifugation), Dichte: 1.086 g/ml.

(-)¹²⁵Jodocyanopindolol (¹²⁵JCYP): Hersteller: Amersham Buchler, Braunschweig; spezifischen Aktivität 2000 Ci/mmol.

(-)Timololmaleat

DL-Dithiothreitol (DTT, Clelands Reagent), L-Dithiothreitol, Dithioerythritol, Mercaptoethanol, α -Monothioglycerol: Hersteller: Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.

Blutentnahmesystem:

Spritzen zur Blutentnahme (20 ml): steril, zum einmaligen Gebrauch. Hersteller: Pharmaplast Braunschweig AG.

Kanülen zur Blutentnahme: steril, zum einmaligen Gebrauch. Größe: 0.90x38 mm/ 20Gx1.5 (gelb). Hersteller: Hartmann AG. Heidenheim.

Pipetten und Reaktionsgefäße:

Pasteurpipetten aus Glas, Länge 150 mm: Hersteller: Fa. Rudolf Brand GmbH + Co., Wertheim/M.-Glashütte.

Verstellbare Pipetten (200 µl, 1000 µl, 5000 µl): Vertrieb Fa. Abimed, Düsseldorf. Hersteller: Fa. Gilson, Frankreich; Typ Repetman.

Eppendorf Multipipette® 4780 (zum Pipettieren der Zellsuspension): Hersteller: Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg.

Pipettenspitzen für verstellbare Pipetten (gelb, blau): Vertrieb Fa. Abimed, Düsseldorf. Hersteller: Fa. Gilson, Frankreich.

Combitips (0.5 ml, 5 ml, 12.5 ml) für Eppendorf Multipipette® 4780: Hersteller: Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg.

Reaktionsgefäße: PPN-Röhrchen 4ml. Hersteller: C.A. Greiner und Söhne GmbH & Co KG, Nürtingen.

Zentrifugen und Zentrifugengefäße:

Swing-out Zentrifuge der Firma Christ, Schleuderradius 11.5 cm

Festrotor Zentrifuge Typ 8590 der Firma Heraeus-Christ, Osterode.

Zentrifugengefäße 12 ml aus Kunststoff: Hersteller: Fa. Sarstett, Neu-Ulm.

Zentrifugengläser 24 ml aus Kunststoff, verschließbar: Hersteller: C.A. Greiner und Söhne GmbH & Co KG, Nürtingen.

Zentrifugengefäße 30 ml aus Kunststoff: Hersteller: Fa. Beckmann, Palo Alto, Ca., USA.

Geräte und Rechner:

Wasseraufbereitungssystem: Milli-Q watersystem. Hersteller: Millipore Corp., Bedford, Mass., USA.

Coulter Counter, Channelyzer, XY-Schreiber: Hersteller: Coulter Electronics Ltd., Harpenden Herts, England.

Mikroskop der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, Württ..

Ultraschallgerät: Hersteller: Branson Sonic Power Company, Danbury, Conn., USA.

Wasserbad: Gyrotory Water Bath Shaker (model G76); Hersteller: New Brunswick Scientific, New Brunswick, N.J., USA.

Absauganlage: Hersteller: Millipore Corporation, Bedford, Mass., USA. Topf: Mod.Nr. XX2702550; Pumpe: Mod.Nr. 5KH33EN25T.

Whatman® GF/B Filter (Glasfaserfilter zur Absauganlage): Hersteller: Whatman Ltd., Maidstone, England.

Gamma Counter: Auto Gamma Scintillation Spectrometer (model 5260) Hersteller: Hewlett Packard, Palo Alto, Ca., USA.

Rechner: Commodore 3032; Diskettenlaufwerk: Commodore floppy disk 3040; Hersteller: Commodore Business Machines Inc., Palo Alto, Ca., USA.

Plotter: Watanabe Miplot WX4671. Hersteller: Watanabe Instruments Corp., Tokyo, Japan.

2. Isolierung der Lymphozyten aus menschlichem Blut

Man findet dazu in der Literatur verschiedene Modifikationen der Methode nach Böyum (10), durch die mononukleäre Zellen, das sind größtenteils Lymphozyten und auch Monozyten, aus dem Blut isoliert werden. [Anmerkung: Da Lymphozyten und Monozyten eine ähnliche Dichte besitzen, sind sie durch Dichtegradientenzentrifugation mit Lymphopaque nicht zu trennen. Es wäre daher exakter,

die so isolierten Zellen als mononukleäre Zellen zu bezeichnen. Da jedoch in der Literatur die nach dieser Methode isolierten Zellen in überwiegendem Maße als Lymphozyten bezeichnet werden, werde auch ich im Folgenden nur noch von Lymphozyten sprechen.] Die von Autor zu Autor sich ändernden Präparationsverfahren spiegeln die Schwierigkeit wider, aus dem menschlichen Blut eine möglichst reine Lymphozytensuspension zu gewinnen. Bei unseren Untersuchungen wurde die Methode nach Böyum gering modifiziert.

Gesunden freiwilligen Erwachsenen wurde vormittags (zwischen 9⁰⁰ und 11⁰⁰ Uhr) 50-150 ml Blut durch Venenpunktion entnommen und sofort weiterverarbeitet. Das Blut wurde zur Antikoagulation mit EDTA (10mg/ml) versetzt und anschließend mit HH-Puffer im Verhältnis 1:1 verdünnt. Das Blut-Puffer-Gemisch wurde dann mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt.

Prinzip: Eine Zellsuspension und ein Auftrennungsmedium definierter Dichte und Viskosität werden übereinandergeschichtet. Zentrifugiert man nun dieses Zwei-Phasen-System, so ist die Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen proportional zu ihrer Größe und der Differenz ihrer Dichte zur Dichte des Umgebungsmediums. Bei gleicher Dichte von Zellen und Umgebungsmedium wird die Sedimentationsgeschwindigkeit gleich Null.

Das mit Puffer verdünnte Blut wurde dazu mit einer Pasteurpipette vorsichtig (zur Vermeidung von Vermischungen) auf, in 24 ml Zentrifugengefäße verteiltes, Lymphopaque aufgeschichtet (etwa 2 Volumenteile Blut-Puffer-Gemisch auf 1 Volumenteil Lymphopaque). Das als Auftrennungsmedium verwendete Lymphopaque besteht aus einer wässrigen Lösung verschiedener Polydextrane und Natrium-Metrizoat (Dichte 1.086 g/ml). Es trennt die zellulären Bestandteile des Blutes hauptsächlich in zwei Fraktionen: Lymphozyten mit Monozyten (mononukleäre Zellen) und Erythrozyten mit Granulozyten.

Das Blut-Lymphopaque-System wurde dann 30 Minuten in einer Swing-out Zentrifuge bei 800g (2500 U/min, 11.5cm Schleuderradius) zen-

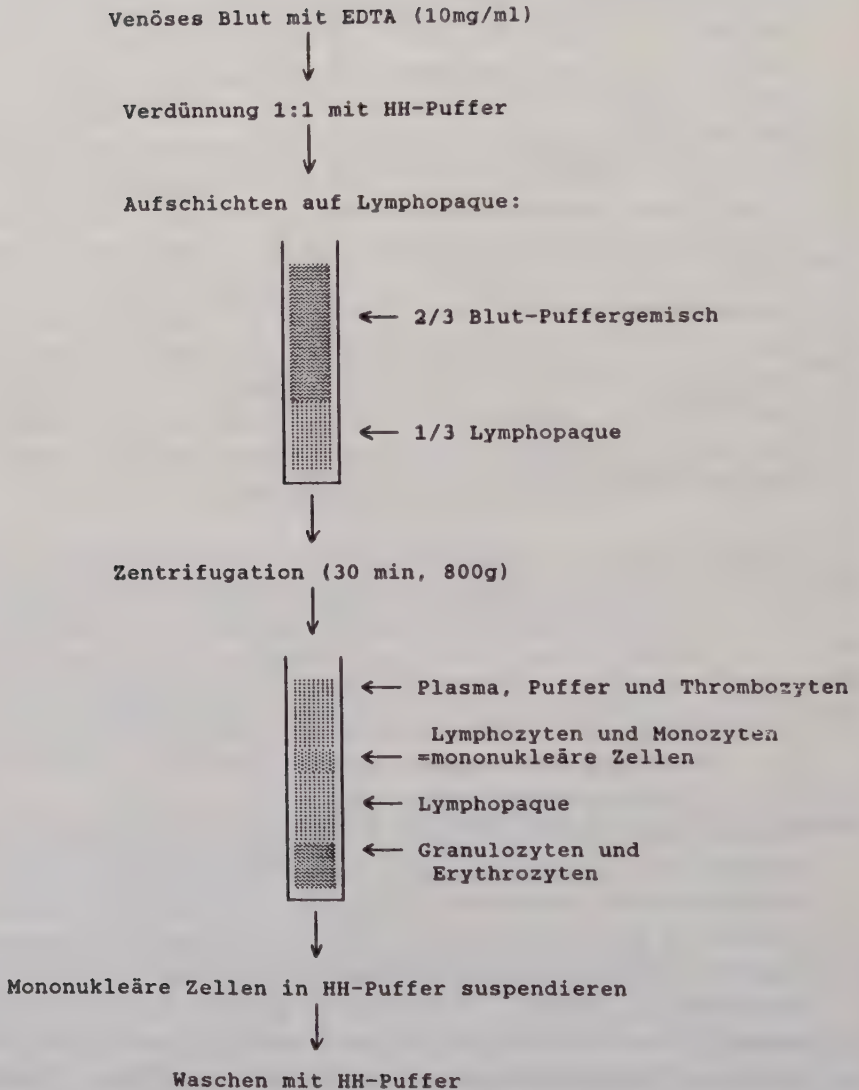


Abb.2. Isolierung der Lymphozyten aus menschlichem Blut (Einzelheiten siehe Abschnitt B.2.)

trifugiert. Anschließend waren in den Zentrifugengefäßen vier Schichten unterscheidbar (von oben nach unten):

- Gemisch aus Plasma und Puffer mit Thrombozyten.
- "Lymphozytenring", bestehend aus Lymphozyten und Monozyten (mononukleäre Zellen).
- Lymphopaque
- Granulozyten und Erythrozyten (Sie gelangen aufgrund ihrer höheren Dichte durch das Lymphopaque hindurch auf den Boden des Gefäßes. Die Granulozyten bleiben auf den Erythrozyten liegen.)

Nun wurde zunächst das Plasma-Puffergemisch mit einer auf schwachen Sog eingestellten Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dann wurde der Lymphozytenring vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und in HH-Puffer suspendiert. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, daß lediglich die weißliche Zellschicht auf dem Lymphopaque erfaßt wurde. (Zuviel miterfaßtes Plasma führt zu einer Verunreinigung mit Serumproteinen und Thrombozyten, zuviel mit abgenommenes Lymphopaque zu einer Verunreinigung mit Granulozyten.)

Danach wurde die Zellsuspension (Lymphozytenring in HH-Puffer) in der Swing-out Zentrifuge 20 Minuten bei 750g (2000 U/min) zentrifugiert. Der Überstand (hauptsächlich HH-Puffer mit Plasmaproteinen und Thrombozyten) wurde verworfen. Das Zellpellet wurde erneut in HH-Puffer aufgenommen und der Waschvorgang noch einmal wiederholt.

Die im Folgenden beschriebenen Bindungsstudien an intakten Zellen wurden mit der so erhaltenen Zellsuspension durchgeführt.

3. Untersuchung der Zellsuspension

Die, wie im vorigen Kapitel beschrieben, präparierte Zellsuspension wurde qualitativ und quantitativ mit einem Zell-counter und -channelyzer untersucht. In den Versuchen zur Bestimmung des Einflusses von Thiolen auf $^{125}\text{JCYP}$ -Bindungsstudien wurde die Vitalität der Zellen überprüft.

3.1. Zählung der Zellen

Die Zellzahl der Zell-Puffer-Suspension wurde mittels eines Zell-counters der Firma Coulter Electronics Ltd. bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit HH-Puffer auf eine Zellkonzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt (entspricht $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in den Inkubationsansätzen, da immer 100µl der Zellsuspension in Ansätze mit 500µl Endvolumen pipettiert wurden).

Die Größenverteilung der zellulären Elemente der Suspension wurde mit einem Coulter-channelyzer analysiert und mittels eines XY-Schreibers aufgezeichnet und so dokumentiert. Der Lymphozytenanteil der Zellpräparation konnte dabei durch Integration des zugehörigen Peaks bestimmt werden.

3.1 Testung der Vitalität der Zellen

Vor und nach Inkubationszeiten zwischen 15 und 120 Minuten wurde die Vitalität von Zellen bestimmt, die zum einen Teil mit und zum anderen Teil ohne die Thiolverbindung Dithiothreitol (DTT) inkubiert wurden. Dazu wurde der Methylenblau-Ausschlußtest verwendet: Zwei bis drei Tropfen der Zellsuspension wurden mit einem Tropfen einer 1%igen Methylenblaulösung auf einem Objektträger zusammengebracht. Dann wurde unter dem Mikroskop der prozentuale Anteil der Zellen abgeschätzt, die fähig waren, ihr Zytoplasma frei von der Farblösung zu halten. Diese bezeichnet man als vitale Zellen.

4. Erzeugung von Lymphozytenmembranen

Zur Präparation von Lymphozytenmembranen wurde die Zellsuspension zunächst noch einmal abzentrifugiert (Swing-out Zentrifuge, 600g, 10 Minuten), um den für intakte Zellen verwendeten HH-Puffer durch TRIS-Puffer zu ersetzen. Anschließend wurden die Zellen durch dreimalige Anwendung von Ultraschall zerschlagen. Die Ober-

tragung des Ultraschalls ins Puffermedium und damit auf die Zellen erfolgte mit einem sich konisch verjüngenden Metallstab, der in die Zellsuspension eingetaucht wurde. Die Beschallungszeiten betrugen dreimal drei Sekunden bei einer Amplitude von 12 μ m (peak to peak). Die so erhaltenen Membranen wurden mit einer Festrotor-Zentrifuge (Fa. Heraeus Christ) 30 Minuten bei 15000g zentrifugiert und wieder in TRIS-Puffer aufgenommen. Nach Aufwirbeln des Pellets wurde erneut Ultraschall in der eben beschriebenen Weise angewandt um Zusammenballungen von Membranvesikeln im Pellet wieder aufzulösen.

5. Sättigungsexperimente

Rezeptoren tragendes Gewebe wird bis zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Ausbildung (Assoziation) und Wiederauflösung (Dissoziation) der Rezeptorbindung von Liganden mit steigenden Konzentrationen eines Radioliganden inkubiert. Anschließend wird der spezifisch an die Rezeptoren gebundene Anteil des Radioliganden bestimmt. Aus diesen Bindungsdaten kann dann aufgrund mathematischer Modelle und Gleichungen die Rezeptorendichte und die Affinität des Radioliganden zu den Rezeptoren berechnet werden.

5.1. Theoretische Grundlagen

5.1.1. Die Sättigungskurve

Das einfachste Modell der Wechselwirkung zwischen Liganden und Rezeptoren setzt einen einheitlichen univalenten Liganden und eine einzige Klasse einheitlicher, voneinander unabhängiger Bindungsstellen (Rezeptoren) voraus. Diese Situation läßt sich unter Zugrundelegung des Massenwirkungsgesetzes durch eine einfache bi-

molekulare Reaktion (Reaktion zweiter Ordnung) zwischen einem Liganden und einem Rezeptor beschreiben (15,72):



R = Rezeptor

L = Ligand

RL = Rezeptor-Ligand-Komplex

k_{+1} = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Die Anzahl der durch den Liganden besetzten Rezeptoren ist also abhängig von der Konzentration an Rezeptor und Ligand, sowie von den Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung (Assoziation) und den Zerfall (Dissoziation) des Rezeptor-Ligand-Komplexes. Befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht, d.h. Assoziation und Dissoziation gehen gleich schnell vor sich, so ist nach dem Massenwirkungsgesetz die Gleichgewichtsdissoziationskonstante definiert als:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} \quad (2)$$

K_D = Gleichgewichtsdissoziationskonstante

[L] = Konzentration des Liganden

[R] = Konzentration des freien Rezeptors

[RL] = Konzentration des durch den Liganden besetzten Rezeptors (Rezeptor-Ligand-Komplex)

Sind 50% der Rezeptoren durch den Liganden besetzt, so gilt:

$$[R] = [RL] \quad (3)$$

Setzt man diese Beziehung in Gleichung 2 ein, so ergibt sich:

$$K_D = [L] \quad (4)$$

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) gibt also diejenige freie Ligandenkonzentration an, bei der 50% der Rezeptoren besetzt sind. Sie verhält sich umgekehrt proportional zur Affinität

eines Liganden zu einem bestimmten Rezeptor und dient somit als Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor. Eine hohe K_D entspricht also einer niedrigen Affinität, während eine niedrige K_D einer hohen Affinität des Liganden zum Rezeptor entspricht.

Weiterhin muß für die Gleichung 2 berücksichtigt werden, daß die totale Rezeptorkonzentration $[R_T]$ sich aus der Summe der freien Rezeptorkonzentration $[R]$ und der Konzentration der im Komplex $[RL]$ gebundenen Rezeptoren zusammensetzt:

$$[R_T] = [R] + [RL] \quad (5)$$

oder:

$$[R] = [R_T] - [RL] \quad (6)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 6 in Gleichung 2 folgt:

$$K_D = \frac{([R_T] - [RL]) \cdot [L]}{[RL]} \quad (7)$$

Umformen und Auflösung nach $[RL]$ ergibt:

$$\begin{aligned} K_D \cdot [RL] &= [R_T] \cdot [L] - [RL] \cdot [L] \\ K_D \cdot [RL] + [RL] \cdot [L] &= [R_T] \cdot [L] \\ [RL] \cdot (K_D + [L]) &= [R_T] \cdot [L] \\ [RL] &= \frac{[R_T] \cdot [L]}{K_D + [L]} \end{aligned} \quad (8)$$

In der Literatur hat sich dafür eine andere Nomenklatur eingebürgert:

$[RL] = B$ (bound)

$[L] = F$ (free)

$[R_T] = B_{max}$ (maximal number of binding sites)

Aus Gleichung 8 ergibt sich so:

$$B = \frac{B_{\max} \cdot F}{K_D + F} \quad (9)$$

Diese Gleichung stellt die allgemeine Sättigungsfunktion dar (Abb.3.). Sie ist der Michaelis-Menten-Gleichung der Enzymkinetik äquivalent (72).

Anmerkung: Die freie Ligandenkonzentration (F) ist nur dann identisch mit der Gesamtkonzentration des Liganden, wenn dieser in großem Überschuß in Bezug auf die Menge an gebundenem Liganden vorliegt. Ist dies nicht der Fall, so muß F als Differenz aus der Gesamtkonzentration und der gebundenen Konzentration des Liganden berechnet werden.

Wie in Abbildung 3 ersichtlich, können, sofern ein Bindungsplateau erreicht wird, die Bindungsparameter $B_{\max}$ und K_D eines Liganden aus der Sättigungskurve abgelesen werden. Dieses Bindungsplateau kann jedoch, aufgrund der dafür notwendigen hohen Ligandkonzentrationen und wegen der Streuung der Meßpunkte, experimentell meist nicht sicher bestimmt werden. Deshalb ist man bestrebt, eine lineare Beziehung zwischen den Bindungsdaten eines Sättigungsexperiments herzustellen.

Um die Ermittlung von $B_{\max}$ und K_D auf der Basis einer linearen Regression zu ermöglichen muß jedoch die Bindungskurve durch Transformation in eine lineare Form gebracht werden. Hierzu existieren eine Reihe von Verfahren (72). Dabei ist das gebräuchlichste Transformationsverfahren für Bindungsdaten aus Sättigungsexperimenten der Scatchard-Plot.

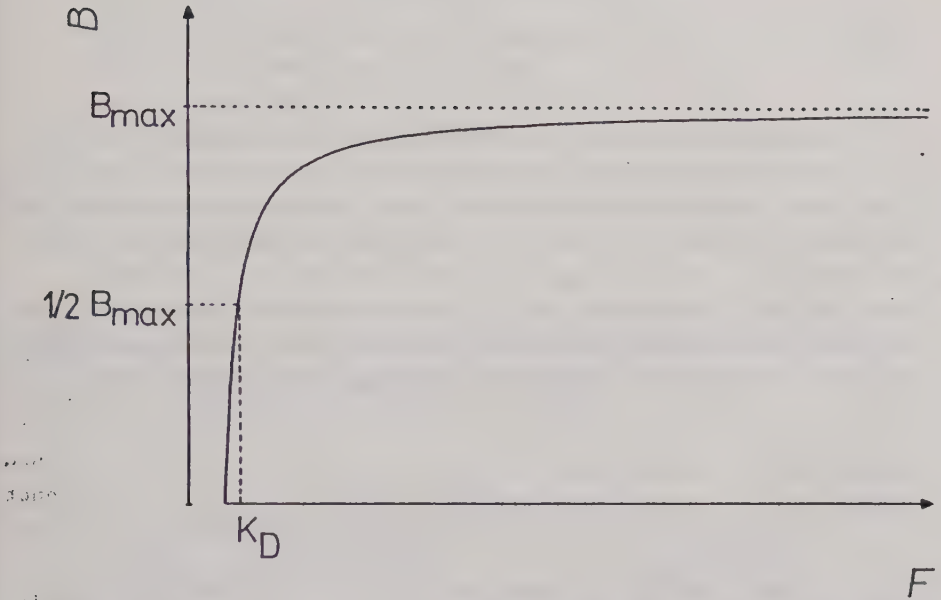


Abb.3. Sättigungskurve: Sie dient der Darstellung von Sättigungsexperimenten durch Auftragung des spezifisch gebundenen Radioliganden (B) gegen die Konzentration des freien Radioliganden (F). Bei hohen Konzentrationen des freien Radioliganden erreicht die Kurve ein Bindungsplateau. Der Schnittpunkt der Asymptote an dieses Plateau mit der Ordinate ergibt die maximale Bindungskapazität (B_{max}). Der Schnittpunkt des Lots von dem Punkt der Kurve bei dem 50% der Rezeptoren besetzt sind ($1/2 B_{max}$) mit der Abszisse ergibt die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D .

5.1.2. Der Scatchard-Plot

Dieses von Scatchard (63) eingeführte Verfahren zur Linearisierung von Bindungsdaten beruht auf ähnliche Methoden aus der Enzymkinetik.

Die Scatchard-Gleichung läßt sich aus der Sättigungsfunktion (Gleichung 9) ableiten:

$$B = \frac{B_{max} \cdot F}{K_D + F}$$

$$B \cdot (K_D + F) = B_{max} \cdot F$$

$$K_D \cdot B + F \cdot B = B_{\max} \cdot F \quad | \cdot 1/F \cdot K_D$$

$$B/F = -1/K_D \cdot B + B_{\max}/K_D \quad (10)$$

Dieser Ausdruck entspricht einer Geradengleichung ($y = -ax + b$). Den Scatchard-Plot erhält man durch die Auftragung der Konzentration des gebundenen Liganden (B) gegen den Quotienten von gebundenem und freiem Liganden (B/F) wie dies in Abbildung 4 dargestellt ist.

Die Steigung der Geraden ergibt den negativen reziproken Wert der Gleichgewichtsdissoziationskonstante ($-1/K_D$), ihr Schnittpunkt mit der Abszisse (bei $B/F=0$) die Bindungsstellendichte ($B_{\max}$).

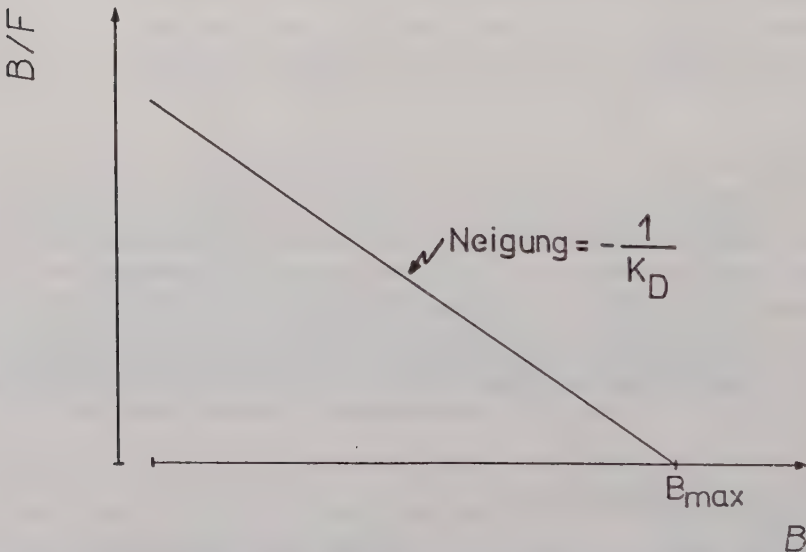


Abb. 4 Scatchard-Plot: Durch Auftragung der Konzentration des gebundenen Liganden gegen den Quotienten aus gebundenem und freiem Liganden erhält man unter der Voraussetzung einer homogenen Rezeptorpopulation eine Linearisierung der Sättigungskurve. Aus der Neigung der Geraden ($-1/K_D$) kann die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D , aus ihrem Abszissenschnittpunkt die Menge der Bindungsstellen ($B_{\max}$) berechnet werden.

Damit ist der einfache Fall einer homogenen Rezeptorpopulation mit nichtinteragierenden Bindungsstellen (linearer Scatchard-Plot) beschrieben.

Ergeben sich jedoch von einer Geraden abweichende Kurvenverläufe im Scatchard-Plot, so kann diese graphische Auftragung in begrenztem Umfang zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Rezeptormodellen dienen. Beispielsweise führt positive Kooperativität zu einer nach oben konvexen Kurve im Scatchard-Plot, die Ausdruck dafür ist, daß durch die Bindung des Liganden die Affinität der noch unbesetzten Bindungsstellen zunimmt. Eine nach oben konkave Kurve kann sowohl Ausdruck einer negativen Kooperativität als auch zweier unabhängiger Rezeptorpopulationen mit unterschiedlichen Affinitäten zum Liganden sein (49).

5.1.3. Spezifische und unspezifische Bindung

Das bisher über die Ligandenbindung Gesagte bezog sich ausschließlich auf die Bindung von Liganden an spezifische Bindungsstellen (Rezeptoren). Diese sind charakterisiert durch eine begrenzte Anzahl und eine relativ hohe Affinität des Liganden zu ihnen. Da die Anzahl spezifischer Bindungsstellen nur eine endliche Zahl sein kann, muß die spezifische Bindung ebenfalls endlich, d.h. sättigbar sein. Dies entspricht dem Erreichen eines Bindungsplateaus (Abb.3. und Abb.5.).

Liganden binden aber nie ausschließlich an spezifische Bindungsstellen, sondern immer auch unspezifisch an andere Strukturen. Solche unspezifische Bindungsorte unterscheiden sich von den spezifischen Bindungsstellen durch ihre nahezu unbegrenzte Anzahl und durch eine sehr niedrige Affinität der Liganden ihnen gegenüber. Unspezifische Bindungsorte können sein: Proteine, Lipide, Glykane, Zellmembranen und -kompartimente, sowie Materialien, die während des Versuchs verwendet werden, wie Kunststoffe oder Filteroberflächen. Da unspezifische Bindungsorte in nahezu unendlicher Anzahl vorhanden sind, erreicht die unspezifische Bindung eines Liganden kein Bindungsplateau, sie ist also nicht sättig-

bar. Die Bindungskurve unspezifischer Bindungsorte stellt sich deshalb als eine durch den Nullpunkt gehende Gerade dar (Abb.5.).

Nun zur Bedeutung dieser Zusammenhänge für die praktische Durchführung von Sättigungsexperimenten mittels eines Radio-Rezeptor-assays:

Dabei wird in einem Versuchsansatz das zu untersuchende, Rezeptoren tragende Gewebe mit steigenden Konzentrationen eines Radioliganden solange inkubiert, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation eingestellt hat (=Äquilibrierung). Anschließend wird der an das Gewebe gebundene Anteil des Radioliganden vom ungebundenem, freien Anteil im Inkubationsmedium abgetrennt (siehe B.5.1.4) und gemessen. Die sich daraus ergebende Bindungskurve repräsentiert, wie aus dem oben gesagten hervorgeht, die Summe der Bindung des Radioliganden an spezifische Bindungsstellen (Rezeptoren) und unspezifische Bindungsorte. Sie wird deshalb auch als Gesamtbindungskurve benannt (---- in Abb.5.).

Parallel dazu wird in einem zweiten Versuchsansatz die unspezifische Bindung des Radioliganden bestimmt. Dabei wird das zu untersuchende Gewebe auch mit steigenden Konzentrationen des Radioliganden äquilibriert, aber im Gegensatz zum ersten Versuchsansatz in Gegenwart eines großen Übersusses eines zweiten, unmarkierten Liganden. Der Anteil der selektiven Rezeptorbindung des Radioliganden (spezifische Bindung) wird so wegen des Überschusses des unmarkierten, aber ebenfalls selektiv an die Rezeptoren bindenden zweiten Liganden, aus seiner Bindung verdrängt. Man nennt den unmarkierten Liganden deshalb auch Verdränger. Angesichts ihrer hohen Zahl und geringen Affinität werden dagegen die unspezifischen Bindungsstellen in ihrer Wechselwirkung mit dem Radioliganden hiervon nicht meßbar beeinflusst. Die nach Abtrennung des ungebundenen Liganden aus diesem Versuchsansatz resultierende Bindungskurve entspricht also der unspezifischen Bindung (- - - in Abb.5.).

Aus diesen beiden Versuchsansätzen läßt sich nun durch einfache Subtraktion der Bindungsdaten aus Gesamtbindung und unspezifischer Bindung die spezifische Bindung des Radioliganden ermitteln (— in Abb.5.).

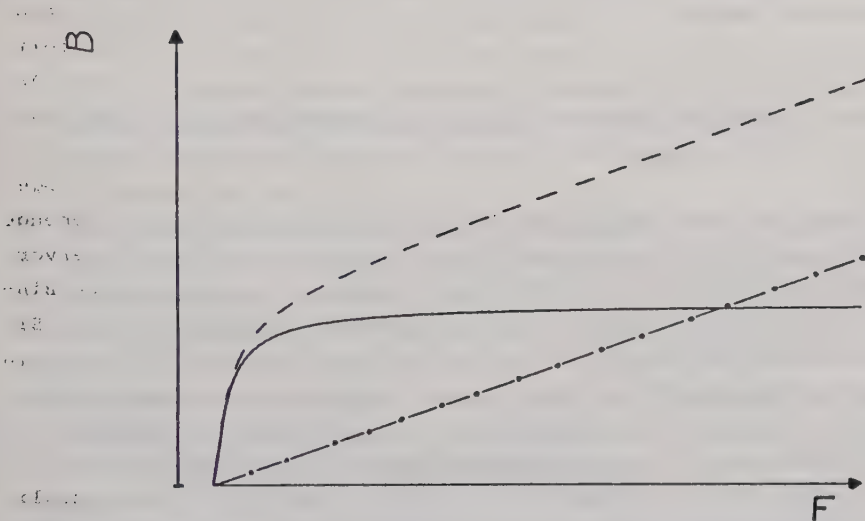


Abb. 5. Bindungskurven eines Radioliganden an Rezeptoren tragendes Gewebe: Die Gesamtbindung (----) des Radioliganden an das Gewebe setzt sich aus spezifischer und unspezifischer Bindung zusammen. Die unspezifische Bindung des Radioliganden (-.-.-) wird in Gegenwart eines Überschusses eines zweiten, nicht markierten Liganden (Verdränger) bestimmt (dadurch erfolgt eine Verdrängung des Radioliganden von den spezifischen Bindungsstellen). Sie ist nicht sättigbar (linear, kein Bindungsplateau). Aus der Differenz von Gesamt- und unspezifischer Bindung ergibt sich die spezifische, sättigbare Rezeptorbindung (—; Bindungsplateau).

5.1.4. Trennung des gebundenen vom freien Liganden

Die Beendigung von Bindungsreaktionen erfolgt durch Trennung des gebundenen Radioliganden von dem im Inkubationsmedium verbleibenden freien Liganden. Die dazu üblichen Methoden sind Filtration

und Zentrifugation.

Bei der in den meisten Fällen angewandten Filtrationsmethode wird das Inkubationsgemisch auf ein über ein Vakuum platziertes Filter gegeben. Durch das Vakuum wird die Inkubationslösung abgezogen. Das Gewebe und die daran gebundene Radioaktivität bleiben auf dem Filter zurück. Gewebe und Filter müssen anschließend zur Auswaschung des ungebundenen Liganden mit einem eiskalten Medium nachgewaschen werden.

5.2. Sättigungsexperimente mit $(-)^{125}$ Jodocyanopindolol an Lymphozyten und deren Beeinflussung durch Dithiothreitol

In unseren Versuchen bestand das zu untersuchende Gewebe aus intakten und zerschlagenen menschlichen Lymphozyten. Als Radioligand verwendeten wir $(-)^{125}$ Jodocyanopindolol (125 JCYP) und als zweiten, unmarkierten Liganden $(-)$ -Timolol (Verdränger). Als Inkubationsmedium diente HH-Puffer in den Versuchen an intakten Lymphozyten und TRIS-Puffer in den Versuchen an Lymphozytenmembranen.

Zur Bestimmung der Gesamtbindung wurden intakte Zellen ($0.5 \cdot 10^6$ Zellen/500 μ l), bzw. Membranen ($0.5 \cdot 10^6$ zerschlagene Zellen/500 μ l) mit acht bis sechzehn verschiedenen 125 JCYP Konzentrationen zwischen 1.5 und 600 pmol/l in Einzelproben zu 0.5 ml 120 Minuten lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Diese Bedingungen sind ausreichend für die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Assoziation und Dissoziation (Äquilibrium).

Parallel dazu wurde die nicht-sättigbare Bindung des Radioliganden durch Inkubation in Anwesenheit des Verdrängers $(-)$ -Timolol im Überschuß (10^{-6} mol/l) bestimmt (unspezifische Bindung).

Zur Untersuchung des Einflusses von Dithiothreitol (DTT) auf die spezifische Bindung des Radioliganden wurde dem Inkubationsgemisch in beiden Versuchsansätzen (mit und ohne Timolol) DTT zugesetzt (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} mol/l).

Die Inkubationsphase wurde in beiden Versuchsansätzen durch Zuga-

be der Zell-, bzw. Membransuspension gestartet. Am Ende der Inkubation wurde die an das Gewebe gebundene Radioaktivität vom freien, ungebundenen Radioligand im Inkubationsmedium durch radiochemische Vakuumfiltration über Whatman® GF/B Glasfaserfilter getrennt und damit die Inkubationsphase beendet. Die an die Filter adsorbierten Zellen, bzw. Zellfragmente wurden zur Auswaschung von ungebundenem $^{125}\text{JCYP}$ dreimal mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung (jeweils 3 ml) nachgewaschen.

Anschließend wurde die im Filtrerrückstand verbleibende Radioaktivität in einem Beckman Zweikanal Gammacounter mit einer durchschnittlichen Ausbeute (efficiency) von 80% gemessen. [^{125}J zerfällt mit einer Halbwertszeit von 60 Tagen unter Abgabe von γ -Strahlen zu Tellur.]

Die Differenz der Bindung aus den Inkubationen in Abwesenheit von Timolol (Gesamtbindung) und in Anwesenheit von Timolol (unspezifische Bindung) ergab die spezifische $^{125}\text{JCYP}$ Bindung. Dabei wurde jeder Meßpunkt als Doppel- oder Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die freie $^{125}\text{JCYP}$ Konzentration wurde durch Subtraktion der gebundenen Konzentration von der eingesetzten Konzentration des Radioliganden für jeden Meßpunkt berechnet.

Durch Anpassung der spezifischen Bindung in Abhängigkeit von der freien $^{125}\text{JCYP}$ Konzentration an die allgemeine Form der Sättigungsfunktion für eine oder mehrere voneinander unabhängige Klassen von Bindungsstellen (Gleichung 11) konnten die Bindungsparameter K_{D1} und $B_{\text{max}1}$ errechnet werden.

$$B = \sum_{i=1}^n B_i = \sum_{i=1}^n \frac{B_{\text{max}i} \cdot F}{K_{D1} + F} \quad (11)$$

- B = Konzentration des spezifisch gebundenen Liganden
- B_i = Konzentration des spezifisch an Bindungsstellen der Klasse i gebundenen Liganden
- F = Konzentration des ungebundenen (freien) Liganden
- $B_{\text{max}i}$ = Anzahl der Bindungsstellen der Klasse i pro Zelle
- K_{D1} = Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindungsstellen der Klasse i

In der Kurvenanpassung für zwei voneinander unabhängige Klassen von Bindungsstellen ($n=2$ in Gleichung 11) waren B_{max1} und K_{D1} die Bindungsparameter für die hochaffine Bindungsstelle, während B_{max2} und K_{D2} die niederaffine Bindungsstelle charakterisierten.

Sättigungsexperimente, die in einem schmalen Konzentrationsbereich des Radioliganden (1.5-60 pmol/l) durchgeführt wurden, und die ausschließlich der Ermittlung der Parameter der hochaffinen Bindungsstelle dienten, paßten wir nach Gleichung 12 unter der vereinfachenden Annahme der Existenz einer hochaffinen und einer nichtsättigbaren niederaffinen Bindungsstelle ($K_D \rightarrow \infty$) an:

$$B = \frac{B_{max} \cdot F}{K_D + F} + C \cdot F \quad (12)$$

- B = Konzentration des spezifisch gebundenen Liganden
F = Konzentration des ungebundenen Liganden
 B_{max} = Anzahl hochaffiner Bindungsstellen pro Zelle
 K_D = Gleichgewichtsdissoziationskonstante der hochaffinen Bindungsstelle
C = die der nichtsättigbaren Bindungsstelle zugehörige Konstante

6. Dosis-Wirkungsbeziehung des Effekts von Thiolen auf die spezifische Bindung von (-)¹²⁵Jodocyanopindolol an Lymphozyten

Hier handelte es sich ebenfalls um Versuche unter Äquilibriumbedingungen (Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation der Liganden). Dabei wurde der Einfluß von steigenden Konzentrationen verschiedener Thiolverbindungen (L-, DL-Dithiothreitol, Dithioerythritol, α -Monothioglycerol, Mercaptoethanol) auf die spezifische Bindung bei einer bestimmten Konzentration des Radioliganden gemessen. Die spezifische Bindung bei der gewählten ¹²⁵JCYP Konzentration (2.1 pmol/l in den Versuchen an intakten Lymphozyten, 4.1 pmol/l in den Versuchen an Membranen) wurde wie unter B.5.2. bestimmt, wobei den Inkubationsansätzen ansteigende

Konzentrationen (10^{-7} - 10^{-1} mol/l) des jeweiligen Thiols zugesetzt waren.

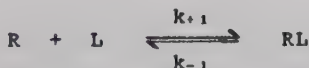
Die für jede Thiolkonzentration gemessene (abnehmende) spezifische Bindung des Radioliganden wurde in % des Ausgangswertes ohne Thiolzusatz (entspricht 100%) in einer sogenannten Dosis-Wirkungskurve dargestellt. Der IC_{50} -Wert entspricht dabei der Thiolkonzentration, bei der es zu einer Abnahme der spezifischen Bindung des Radioliganden um 50% kam.

7. Dissoziationskinetiken

Bei den kinetischen Experimenten handelt es sich um einen zweiten Typ von Versuchen. Sie beruhen auf der Bestimmung der Bindung in Abhängigkeit von der Zeit (t). Die von uns durchgeführten Dissoziationskinetiken dienten der Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von $^{125}JCYP$ und der Untersuchung des Einflusses der Thiolverbindung DTT auf die Dissoziation dieses Radioliganden von menschlichen Lymphozyten.

7.1. Theoretische Grundlagen

Aus der unter B.5.1 beschriebene Gleichung 1 für die Bildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes unter der Voraussetzung eines einheitlichen Liganden und einer einheitlichen, nicht interagierenden Rezeptorpopulation



lassen sich die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} ableiten nach

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] - k_{-1} \cdot [RL] \quad (13)$$

Danach ist die Nettobildungsgeschwindigkeit des RL-Komplexes gleich der Differenz seiner Bildungsrate (Assoziation: $k_{+1} \cdot [R] \cdot [L]$) und seiner Dissoziationsrate ($k_{-1} \cdot [RL]$).

Anmerkung: Im Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation (Äquilibrium) ist die Nettobildungsgeschwindigkeit des RL-Komplexes $d[RL]/dt = 0$ (d.h. es wird pro Zeiteinheit genauso viel RL gebildet wie auch zefällt). Also gilt dann:

$$0 = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] - k_{-1} \cdot [RL]$$

oder: $k_{-1} \cdot [RL] = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L]$

$$\frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]}$$

Dieser Ausdruck entspricht folglich der Gleichung (2), die die Bildungsreaktion des RL-Komplexes unter Gleichgewichtsbedingungen beschreibt.

Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{-1}) kann bestimmt werden nach Ausschaltung der Assoziation ($k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] = 0$). Es handelt sich bei der dann alleine übrigbleibenden Dissoziationsreaktion um eine Reaktion erster Ordnung (15), d.h. die Dissoziationsgeschwindigkeit (=Geschwindigkeit des Zerfalls von RL) ist nur abhängig von der Konzentration des RL-Komplexes. [Im Gegensatz dazu stellt die Assoziationsreaktion eine Reaktion zweiter Ordnung dar, d.h. die Assoziationsgeschwindigkeit (=Geschwindigkeit der Bildung des RL-Komplexes) hängt sowohl von der Rezeptorkonzentration [R] als auch von der Ligandkonzentration [L] ab.]

Praktisch verfährt man bei der Bestimmung von k_{-1} so, daß Radioligand und Gewebe bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert werden. Die Ausschaltung der Assoziationsreaktion, die die Messung der Dissoziationskinetik ermöglicht, kann dann auf zwei Wegen erfolgen (72):

1. Der Inkubationsansatz wird durch Zugabe von Puffer auf das

über 100-fache verdünnt. Dadurch wird die Konzentration des freien Liganden so klein, daß die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens von freiem Ligand und freiem Rezeptor (Assoziation) vernachlässigbar klein wird.

2. Der zweite, in seiner praktischen Durchführung einfachere und deshalb auch häufiger gewählte Weg, besteht darin, dem Inkubationsansatz einen unmarkierten Liganden im Überschuß zuzugeben, so daß alle freien Bindungsstellen durch diesen besetzt werden. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit, daß sich der aus seiner Bindung abdissoziierende Radioligand in einer Assoziationsreaktion erneut an den Rezeptor anlagert, sehr gering, da eine freiwerdende Rezeptorstelle sofort mit dem in weit höherer Konzentration vorliegenden unmarkierten Liganden besetzt wird.

In beiden Fällen werden dann die zeitabhängig sinkenden Mengen an spezifisch gebundenem Radioliganden bestimmt.

Für die auf diese Weise meßbar gewordene Dissoziationsreaktion läßt sich aus Gleichung 13 eine mathematische Beziehung ableiten:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] - k_{-1} \cdot [RL]$$

Da die Assoziationsreaktion gehemmt ist ($k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] = 0$), folgt:

$$\frac{d[RL]}{dt} = -k_{-1} \cdot [RL]$$

Wenn zur Zeit Null ($t=0$), d.h. zu Beginn der Dissoziationskinetik, $[RL]_0$ Rezeptor-Ligand-Komplexe vorhanden sind, so gilt für die noch nicht dissoziierten RL-Komplexe zur Zeit t $[RL]_t$:

$$[RL]_t = [RL]_0 \cdot e^{-k_{-1} \cdot t} \quad (14)$$

oder in der für Rezeptorbindungsstudien üblichen Nomenklatur (siehe B.5.1.1.):

$$B_t = B_0 \cdot e^{-k_{-1} \cdot t} \quad (15)$$

B_0 = Konzentration des zu Beginn der Dissoziation ($t=0$) spezifisch gebundenen Liganden
 t = Zeit nach dem Starten der Dissoziationsreaktion
 B_t = Konzentration des zur Zeit t spezifisch gebundenen Liganden
 k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Diese Gleichung stellt die allgemeine Dissoziationsfunktion dar (Abb.6.A; (72)). Sie ist typisch für Geschwindigkeitsreaktionen erster Ordnung (worum es sich z.B. auch beim Zerfall eines radioaktiven Nuklids handelt; Gleichung 15 ist dem radioaktiven Zerfallsgesetz äquivalent).

Durch Logarithmieren und Auflösen nach dem Exponenten kann diese Exponentialfunktion in eine lineare Form transformiert werden:

$$B_t = B_0 \cdot e^{-k_{-1} \cdot t}$$

$$\frac{B_t}{B_0} = e^{-k_{-1} \cdot t}$$

$$\ln \frac{B_t}{B_0} = -k_{-1} \cdot t \quad (16)$$

Dieser Ausdruck entspricht einer Geradengleichung ($y = -ax$). Durch Auftragung der Zeit t gegen $\ln B_t/B_0$ (=halblogarithmische Auftragung) erhält man also eine lineare Beziehung für das Dissoziationsverhalten des Liganden (Abb.6.B). Die Steigung dieser Geraden ergibt den negativen Wert der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} .

Die Halbwertszeit der Dissoziationsreaktion $t_{1/2}$, also die Zeit nach der noch 50% des Radioliganden spezifisch gebunden sind (be-

zogen auf die zu Beginn der Dissoziation spezifisch gebundene Menge des Radioliganden B_0), läßt sich dabei entweder graphisch (siehe Abb.6.) oder rechnerisch ermitteln:

Zur Zeit t_x gilt $B_t = \frac{1}{2} B_0$

Durch Einsetzen dieses Terms in Gleichung 15 und Umformung erhält man:

$$\frac{1}{2} B_0 = B_0 \cdot e^{-k_{-1} \cdot t_x}$$

$$\frac{1}{2} = e^{-k_{-1} \cdot t_x}$$

$$\ln \frac{1}{2} = -k_{-1} \cdot t_x$$

$$-\ln 2 = -k_{-1} \cdot t_x$$

$t_x = \frac{\ln 2}{k_{-1}} = \frac{0.693}{k_{-1}}$	(17)
---	------

Damit ist wiederum der einfache Fall einer homogenen Rezeptorpopulation mit nicht interagierenden Bindungsstellen (lineare Dissoziationskinetik bei halblogarithmischer Auftragung) beschrieben. Häufig ergeben sich dabei jedoch von einer Geraden abweichende Kurvenverläufe. Dies kann auf dem Vorhandensein mehrerer voneinander unabhängiger Klassen von Bindungsstellen, auf Isomerisierungs- oder kooperative Effekte oder auf einem uneinheitlichen Liganden (z.B. verschiedene Stereoisomere) beruhen (49).

7.2. Dissoziationskinetik für (-)-¹²⁵I-Jodocyanopindolol und deren Beeinflussung durch Dithiothreitol

Zunächst wurden intakte Lymphozyten (10⁶ Zellen/ml), bzw. Lymphozytenmembranen (10⁶ zerschlagene Zellen/ml) mit einer bestimmten ¹²⁵IJCYP Konzentration (29.1 pmol/l in den Versuchen an intakten Zellen, 4.1 pmol/l in den Versuchen an Membranen) durch Inkubation im Wasserbad bei 37°C äquilibriert (120 Minuten).

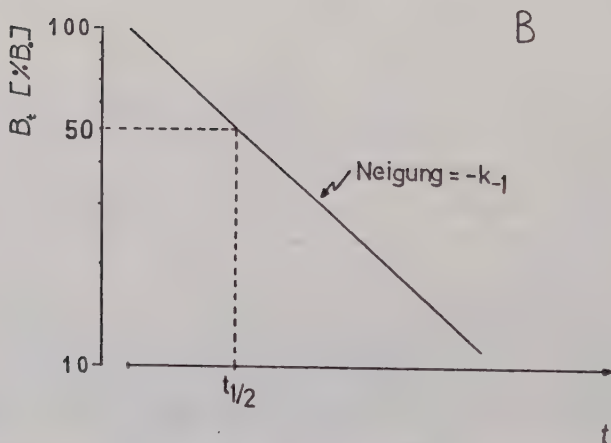
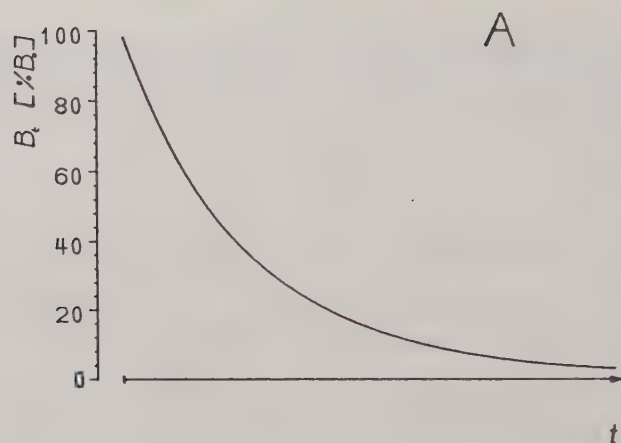


Abb. 6. Dissoziationskinetik: A: Prozentuale Auftragung der zur Zeit t nach Starten der Dissoziationsreaktion spezifisch gebundenen Menge eines Radioliganden B_t bezogen auf die spezifische Bindung zu Beginn der Dissoziation ($B_0 = 100\%$). Man sieht dabei den Verlauf einer exponentiell abklingenden Funktion (Geschwindigkeitsreaktion erster Ordnung). B: Durch halblogarithmische Auftragung dieser Funktion erhält man unter der Voraussetzung einer homogenen Rezeptorpopulation eine Gerade, aus deren Neigung ($-k_{-1}$) die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} berechnet werden kann. Der Schnittpunkt des Lots von dem Punkt der Kurve, bei dem noch 50% des Radioliganden spezifisch gebunden sind, mit der Abszisse ergibt die Halbwertszeit der Dissoziationsreaktion $t_{1/2}$.

Die spezifische Bindung bei dieser $^{125}\text{JCYP}$ Konzentration wurde, wie unter B.5.2. beschrieben, aus der Differenz der Bindung von parallelen Inkubationen in Einzelproben zu 0.5ml in Abwesenheit (Gesamtbindung = Summe aus spezifischer und unspezifischer Bindung) und in Anwesenheit des unmarkierten Liganden (-)-Timolol (10^{-6} mol/l; unspezifische Bindung) bestimmt.

Nach der Äquilibrierungsphase mußte dann zur Messung der Dissoziationsreaktion die Assoziationsreaktion ausgeschaltet werden. Dies wurde erreicht, indem 500 µl Aliquote der mit $^{125}\text{JCYP}$ äquilibrierten Zell-, bzw. Membransuspension auf in PPN-Röhrchen (4ml) vorgelegte 10 µl Aliquote des unmarkierten Liganden Timolol (10^{-6} mol/l Endkonzentration im Ansatz) verteilt wurden.

Zur Untersuchung des Einflusses von DTT auf die Dissoziation des Radioliganden wurden zusätzlich 10 µl Aliquote DTT (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-1} mol/l) vorgelegt.

Diese Einzelproben wurden weiterhin bei 37°C inkubiert. Nach definierten Zeitabständen (zwischen 0 und 300 Minuten) wurde die Reaktion durch rasche Filtration über Whatman GF/B Filter gestoppt (Trennung des gebundenen vom freien Liganden, siehe auch B.5.1.4.). Die Filter wurden anschließend, wie unter B.5.2. beschrieben, gewaschen und im Gammacounter gemessen.

Durch Anpassung der zeitabhängig sinkenden Menge an spezifisch gebundenem $^{125}\text{JCYP}$ an die allgemeine Form der Dissoziationsfunktion für eine oder mehrere Klassen voneinander unabhängiger Bindungsstellen (Gleichung 18) konnten die Bindungsparameter B_{0i} und k_{-i} berechnet werden (49):

$$B_t = \sum_{i=1}^n B_{0i} \cdot e^{-k_{-i} \cdot t} \quad (18)$$

- B_{0i} = Konzentration des zu Beginn der Dissoziation ($t=0$) spezifisch an Bindungsstellen der Klasse i gebundenen Liganden
- t = Zeit nach dem Starten der Dissoziationsreaktion (entspricht der Zeit ab der Zugabe von 10^{-6} mol/l Timolol)
- B_t = Konzentration des zur Zeit t spezifisch gebundenen Liganden
- k_{-i} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante von Bindungsstellen der Klasse i

In der Kurvenanpassung für zwei voneinander unabhängige Klassen von Bindungsstellen ($n=2$ in Gleichung 18) waren B_{01} und K_{-1} die Bindungsparameter für die hochaffine Bindungsstelle, während B_{02} und K_{-2} die niederaffine Bindungsstelle charakterisierten.

8. Untersuchung des Einflusses von Dithiothreitol auf den intrazellulären cAMP-Spiegel

Der intrazelluläre cAMP-Spiegel wurde in drei verschiedenen Versuchsansätzen bestimmt:

- a) ohne Zusätze (=basaler cAMP-Spiegel)
- b) nach Inkubation mit Isoprenalin
- c) nach Inkubation mit Dithiothreitol

Dabei wurden 100 μ l Aliquote der wie unter B.2. beschrieben präparierten Lymphozytensuspension (entsprechend $0.5 \cdot 10^6$ Zellen pro Ansatz (500 μ l)) zu 390 μ l eines speziellen Puffers zur cAMP-Bestimmung (10^{-4} mol/l 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX) und 10^{-3} mol/l Ascorbinsäure in Aqua tridest.) gegeben. Dieses Gemisch wurde 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend wurde den Einzelproben 10 μ l Aliquote des jeweiligen Zusatzes (Isoprenalin, DTT), bzw. 10 μ l Puffer zur Bestimmung des basalen cAMP-Spiegels zugesetzt. Nach 15 minütiger Inkubation der Proben bei 37°C wurde die Suspension aufgekocht (5 Minuten, 100°C , dadurch erfolgt eine Zerstörung der Zellen mit einer Freisetzung des Zellinhalts) und bei 15000 g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde dann die cAMP-Konzentration mit einem RianenTM cAMP [^{125}J] RIA Kit (Hersteller: DuPont, Speciality Diagnostics, North Billerica, Mass., USA) bestimmt.

Der Radioimmunttest (Radioimmunoassay, RIA) ist eine hochempfindliche Methode, die Antigene aller Art sowohl qualitativ als auch quantitativ erfassen kann. Dabei treten das zu bestimmende Antigen (in unserem Fall cAMP-Moleküle im Überstand) und das zugleich

zugeführte radioaktiv markierte Standardantigen ($[^{125}\text{J}]\text{Succinyl-cAMP-tyrosin-methylester}$) in Konkurrenz um eine begrenzte Antikörpermenge. Nach Abtrennung des nicht an einem Immunkomplex beteiligten freien Antigens wird die verbleibende Radioaktivität gemessen. Auf einer Eichkurve, die bei Reaktionen mit bekannten nicht-markierten Antigenmengen ermittelt wurde, kann dann der Gehalt der Probe an Antigen (cAMP) abgelesen werden.

9. Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Alle in dieser Arbeit verwerteten Daten aus Bindungsexperimenten stellen Mittelwerte aus eng korrelierenden Doppel- oder Dreifachbestimmungen dar. Für die Auswertung der Meßergebnisse stand ein Commodore-Rechner (Modell 3032) zur Verfügung, der zur Datenerfassung und -aufbereitung und zur Steuerung eines XY-Plotters der Firma Watanabe (Modell WX 4671) für die graphische Darstellung verwendet wurde.

Die Bindungsparameter wurden durch Anpassung der unter B.5. und B.7. besprochenen Gleichungssysteme an die experimentellen Bindungsdaten mit dem Gauss-Newtonschen Iterationsverfahren nach Hartley berechnet. Dabei wurde ein Computerprogramm (MULTI), das von Kiyoshi Yamaoka et al. (75) entwickelt wurde, angewandt.

Das Prinzip der iterativen nichtlinearen Kurvenanpassung besteht darin, daß aufgrund initialer Parametervorgaben (Schätzwerte) eine theoretische Kurve erstellt wird. Die Abweichungen der experimentellen Daten von dieser Kurve werden in der Summe der Abweichungsquadrate ausgedrückt. Dementsprechend werden in den nun folgenden Iterationsschritten die Parameter so verändert, daß eine immer bessere Anpassung an die vorhandenen Daten, ausgedrückt in der Senkung der Summe der Abweichungsquadrate, erreicht wird.

Als Maß für die Güte der Kurvenanpassung wurde die Abweichungsquadratsumme sowie Akaikes Informationskriterium (AIC; (75)) ver-

wendet. Der Vorteil von AIC liegt darin, daß es die Anzahl der anzupassenden Parameter mitberücksichtigt.

Die statistische Signifikanz der angepaßten Parameter ($P = B_{11}, K_{01}, B_{01}$ und k_{-1}) gegen Null wurde mittels des z-Testes ($H_0: P=0$; (60)) ermittelt. Der Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde mit dem t-Test nach Student durchgeführt (60). $p \leq 0.05$ wurde als signifikant angesehen.

C. ERGEBNISSE

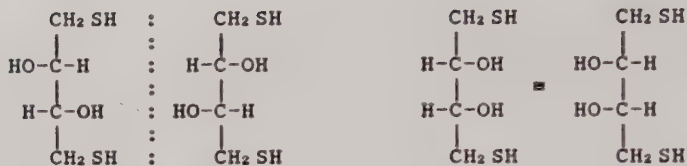
1. Dosis-Wirkungsbeziehung des Effekts von Thiolen auf die spezifische Bindung von (-)-¹²⁵Jodocyanopindolol an Lymphozyten

Experimentelle Messungen der Bindung von ¹²⁵Jodocyanopindolol (¹²⁵JCYP) einer Konzentration von 4.1 pmol/l an Lymphozytenmembranen, bzw. 2.1 pmol/l an intakte Lymphozyten in Anwesenheit von Dithiothreitol (DTT) und anderen Thiolen in Konzentrationen zwischen 10⁻⁶ mol/l und 10⁻¹ mol/l zeigten eine dosisabhängige Abnahme der spezifischen Bindung von ¹²⁵JCYP.

An Membranen zeigten die Dithiole Dithioerythreitol (DTE) und DL-DTT (konstitutionsanaloge Stereoisomere; Abb.7.; (34)) identische Wirkungen. Der halbmaximale Effekt (IC₅₀) lag bei etwa 10⁻⁴ mol/l DTE bzw. DTT, 10⁻² mol/l der Dithiole verhinderte die spezifische Bindung von ¹²⁵JCYP nahezu vollständig (Abb. 8.). α-Monothioglycerol (MTG) und Mercaptoethanol (ME), also zwei Monothiole mit unterschiedlicher Molekülstruktur (Abb.7.), führten ebenfalls zum gleichen Effekt (IC₅₀ bei etwa 5 · 10⁻³ mol/l für beide Monothiole), jedoch in einem im Vergleich zu den Dithiolen etwa 50-fach höheren Konzentrationsbereich (Abb.8.).

Bezüglich der Struktur-Wirkungsbeziehungen erbrachten die Versuche an intakten Lymphozyten ähnliche Ergebnisse: Die konstitutionsanalogen Dithiole DL-DTT, L-DTT und DTE (Abb. 7.) waren gleich wirksam (IC₅₀ etwa 5 · 10⁻³ mol/l), während das Monothiol Mercaptoethanol im Vergleich dazu etwa 50-fach schwächer wirkte (IC₅₀ etwa 10⁻¹ mol/l; Abb. 9.).

Der Vergleich zwischen Membranen und intakten Zellen bezüglich der Wirksamkeit von Mono-, bzw. Dithiolen ergab jedoch eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurven an intakten Zellen zu einem 20- bis 50-fach höheren Konzentrationsbereich (Abb. 10. und Abb. 11.).

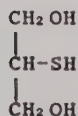


D-DTT

L-DTT

DET

1,4-Dimercapto-butan-2,3-diol in der Fischer-Projektion: Es existieren drei optische Isomere(34), nämlich die Threo-Form (Dithiothreitol=DTT), die in einer D- und einer L-Konfiguration (Spiegelbildisomere) vorkommt, und die Erythro-Form (Dithioerythritol=DET).



Mercaptoethanol (ME)
(Ethanthiol, Ethylmercaptan)

α -Monothioglycerol (MTG)
(2-Mercapto-propan-1,3-diol)

Abb. 7. Molekülstruktur der verwendeten Thiole: Untersucht wurden drei Stereoisomere des Dithiols 1,4-Dimercapto-butan-2,3-diol: DL-Dithiothreitol (DTT), L-Dithiothreitol und Dithioerythritol (DTE), sowie zwei Monothiole unterschiedlicher Molekülstruktur: Mercaptoethanol (ME) und α -Monothioglycerol (MTG).

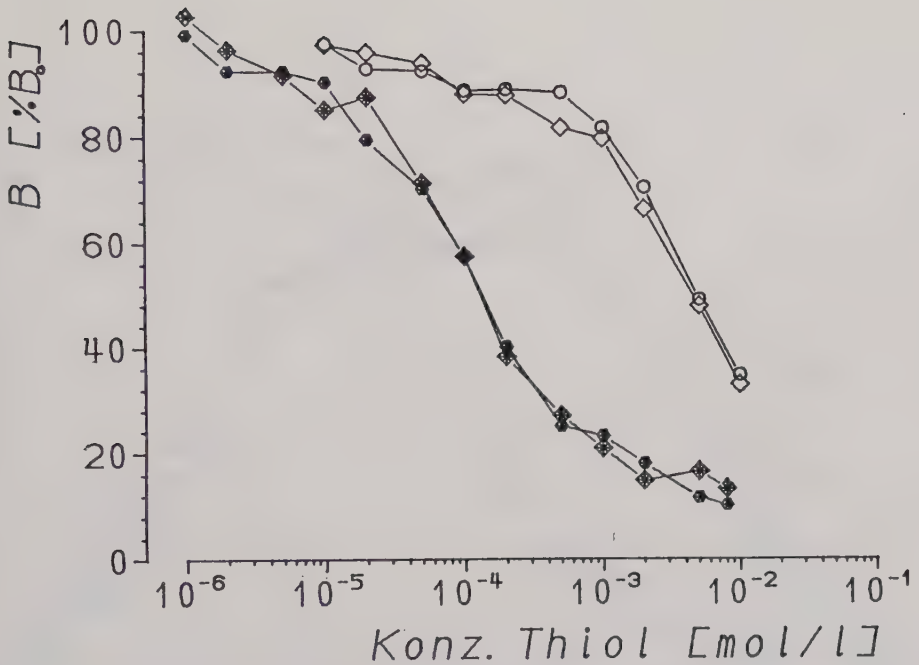


Abb. 8. Dosis-Wirkungskurven für Mono- und Dithiole an Lymphozytenmembranen: Die Membranen ($0.5 \cdot 10^6$ zerschlagene Zellen/500 μ l) wurden in Ansätzen zu 500 μ l mit 4.1 pmol/l 125 JCYP in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen (10^{-6} mol/l - 10^{-2} mol/l) verschiedener Mono- und Dithiole (○=Mercaptoethanol; ◇=α-Monothioglycerol; ◆=DL-Dithiothreitol; ●=Dithioerythritol) zwei Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Diese Inkubationen ergaben nach Abtrennung des ungebundenen 125 JCYP die Gesamtbindung des Radioliganden unter dem Einfluß des jeweiligen Thiols. Die unspezifische Bindung von 125 JCYP an das Gewebe wurde in Anwesenheit von 10^{-6} mol/l des nicht markierten Liganden (-)-Timolol bestimmt (siehe auch B.5.2.). Sie wurde durch die Thiole nicht meßbar beeinflusst. Die Differenz aus Gesamt- und unspezifischer Bindung ergab die spezifische Bindung des Radioliganden. Die unter dem Einfluß steigender Thiolkonzentrationen gemessene abnehmende spezifische Bindung von 125 JCYP wurde in % des Ausgangswertes ohne Thiolzusatz ($B_0 = 100\%$) aufgetragen. Sowohl die konstitutionsanalogen Dithiole als auch die Monothiole zeigten identische, von der Molekülstruktur unabhängige Wirkungen, wobei die Monothiole etwa 50-fach schwächer wirkten als die Dithiole. ($IC_{50} = 10^{-4}$ mol/l für DL-DTT und DTE, $IC_{50} = 5 \cdot 10^{-3}$ mol/l für ME und MTG).

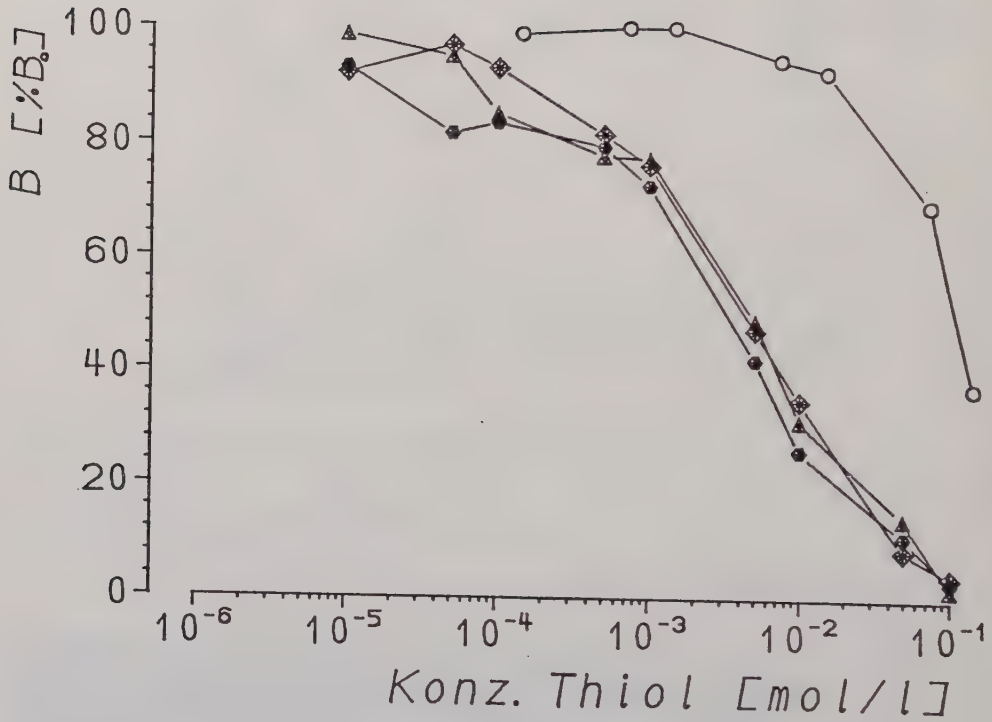


Abb. 9. Dosis-Wirkungskurven für Mono- und Dithiole an intakten Lymphozyten: Die Experimente wurden wie in Abb. 8. beschrieben durchgeführt, wobei 2.1 pmol/l ^{125}I -JCYP und ein Konzentrationsbereich der Thiole von 10^{-5} - 10^{-1} mol/l verwendet wurde. Wie an Membranen waren die Dithiole (●=DL-Dithiothreitol; ▲=L-Dithiothreitol; ◆=Dithioerythritol) gleich wirksam ($\text{IC}_{50} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$), während das Monothiol Mercaptoethanol (○) etwa 50-fach schwächer wirkte ($\text{IC}_{50} = 10^{-1} \text{ mol/l}$).

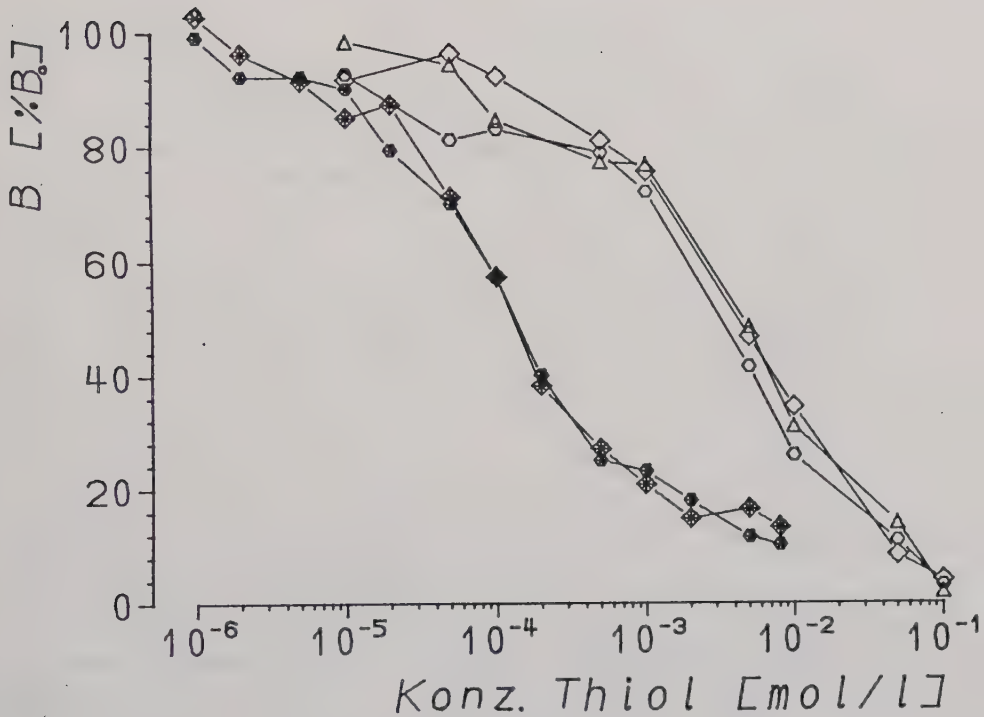


Abb.10. Vergleich der Dosis-Wirkungskurven von Dithiolen an Membranen und intakten Lymphozyten: Gegenüberstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung für Dithiole an Lymphozytenmembranen (○=DL-DTT; ●=L-DTT; siehe auch Abb. 8.) und an intakten Zellen (◐=DL-DTT; ◑=L-DTT; △=DET; siehe auch Abb.9.). Die untersuchten Dithiole waren an Membranen etwa um den Faktor 50 wirksamer als an intakten Zellen ($IC_{50}=10^{-4}$ mol/l für Membranen und $IC_{50}=5 \cdot 10^{-3}$ mol/l für intakte Zellen).

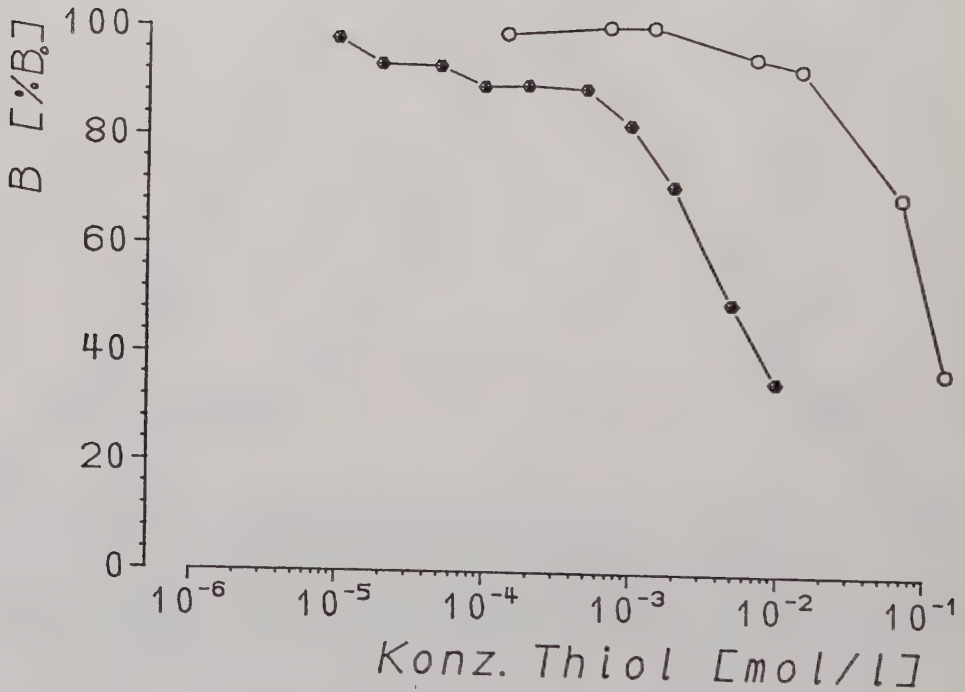


Abb.11. Vergleich der Dosis-Wirkungskurven von Monothiolen an Membranen und intakten Lymphozyten: Das Monothiol Mercaptoethanol wirkte an Membranen (●) etwa 20- bis 50-fach stärker als an intakten Zellen (o).

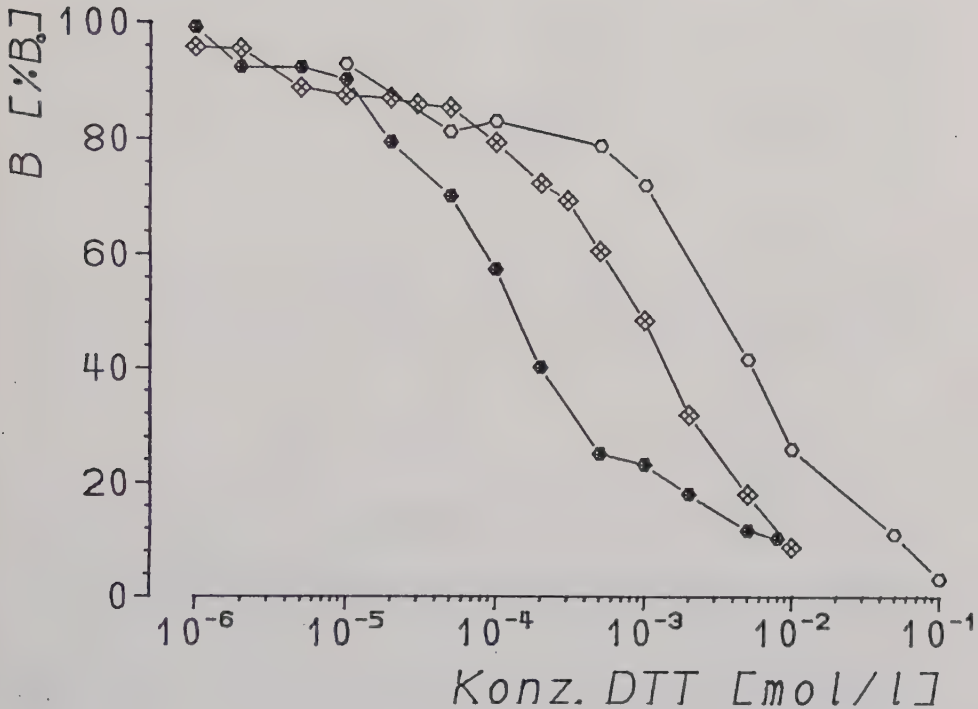


Abb.12. Vergleich der Dosis-Wirkungskurven von DTT an intakten Zellen, gewaschenen und ungewaschenen Membranen: Die Versuche wurden wie in Abb. 8. und Abb. 9. beschrieben durchgeführt (○=intakte Lymphozyten, Präparation: siehe B.2.; ●=gewaschene Lymphozytenmembranen, Präparation: siehe B.4.). In einem dritten Versuchsansatz wurde bei der Membranpräparation darauf verzichtet den kleinmolekularen Zellinhalt durch Waschen und Zentrifugieren abzutrennen (◆=ungewaschene Membranen). Man erkennt eine abnehmende Wirksamkeit von DTT in der Reihenfolge gewaschene Membranen ($IC_{50}=10^{-4}$ mol/l), ungewaschene Membranen ($IC_{50}=10^{-3}$ mol/l), intakte Zellen ($IC_{50}=5 \cdot 10^{-3}$ mol/l).

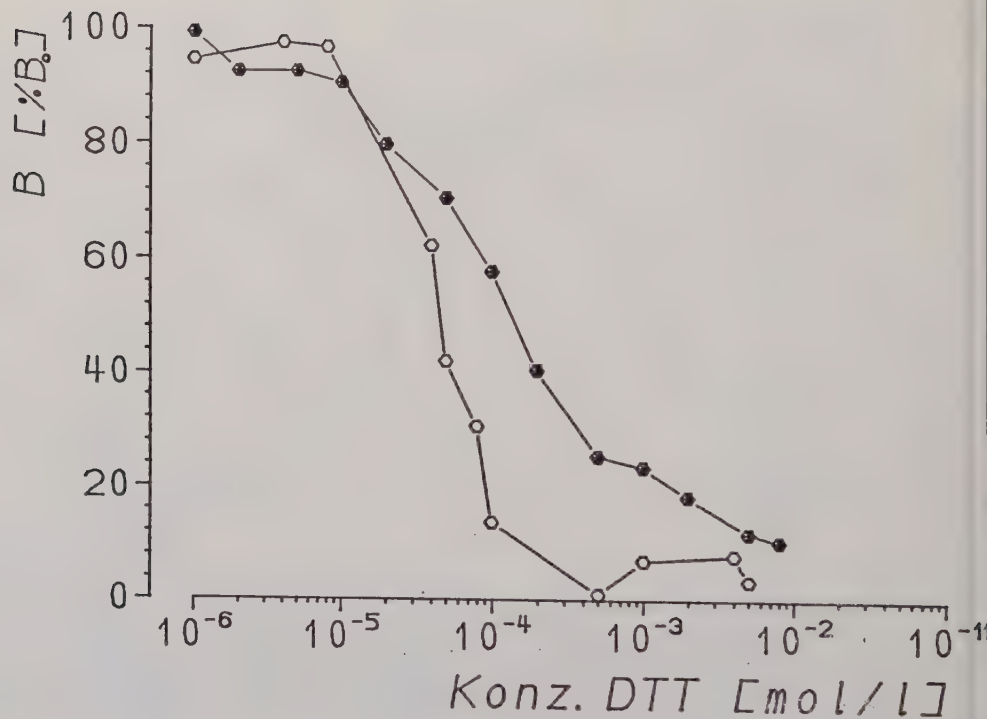


Abb.13. Einfluß einer verlängerten Inkubation mit DTT auf die spezifische Bindung von ¹²⁵JCYP an Lymphozytenmembranen: Lymphozytenmembranen wurden eine Stunde lang mit steigenden DTT-Konzentrationen (10⁻⁶-10⁻² mol/l) bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde die spezifische Bindung von ¹²⁵JCYP wie in Abb. 8. beschrieben, d.h. nach einer weiteren zwei-stündigen Inkubation in Gegenwart der entsprechenden DTT-Konzentrationen, bestimmt (o=mit DTT vorinkubierte Membranen). Dies führte zu einer grösseren Steilheit und zu einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve (IC₅₀=5·10⁻⁵ mol/l und maximaler Effekt bei 10⁻³ mol/l an vorinkubierten Membranen; IC₅₀=10⁻⁴ mol/l und maximaler Effekt bei 10⁻² mol/l an nicht vorinkubierten Membranen (●)).

Der Verzicht auf eine Abtrennung des kleinmolekularen Zellinhaltes durch Zentrifugation und Waschen der Lymphozytenmembranen ("ungewaschene Membranen") bewirkte im Vergleich zu den ansonsten verwendeten "gewaschenen Membranen" (Präparation: siehe B.2.) eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von DTT. Es konnte folgende Reihenfolge bezüglich des DTT-Effekts in Abhängigkeit des untersuchten Lymphozytenpräparats aufgestellt werden: DTT wirkt an gewaschenen Membranen stärker als an ungewaschenen Membranen, und an diesen wiederum stärker als an intakten Zellen (Abb.12.).

Eine verlängerte Inkubation von Lymphozytenmembranen mit DTT führte zu einem steileren und nach links (zu niedrigeren Konzentrationen) verschobenen Verlauf der Dosis-Wirkungskurve von DTT (Abb.13.).

2. Vitalität der Zellen unter dem Einfluß von Dithiothreitol

Die Vitalität intakter Lymphozyten wurde mittels des Methylenblau-Ausschlußtestes überprüft (siehe B.3.1.). Dabei lag der Anteil Methylenblau speichernder Zellen (=nicht vitale Zellen) bei der nicht mit DTT behandelten Lymphozyten nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden (37°C) unter 10%. Steigende DTT-Konzentrationen (etwa ab 10^{-4} mol/l) und längere Inkubationszeiten mit DTT (>15 Minuten) führten zu einem zunehmenden Vitalitätsverlust der Lymphozyten. Nach zweistündiger Inkubation mit 10^{-2} mol/l DTT waren fast ausschließlich Methylenblau speichernde Zellen im Mikroskop sichtbar (Anteil >90%).

3. Einfluß von Dithiothreitol auf Sättigungsexperimente mit

(-)¹²⁵Jodocyanopindolol an menschlichen Lymphozyten

Sättigungsexperimente mit ¹²⁵JCYP über einen weiten Konzentrationsbereich (1.5 - 600 pmol/l) ergaben an Lymphozytenmembranen sowie an intakten Lymphozyten nicht-lineare Kurvenverläufe in der Auftragung nach Scatchard. Eine gute Kurvenanpassung wurde erreicht unter der Annahme von zwei sättigbaren Bindungsstellen für ¹²⁵JCYP, einer hoch- und einer niederaffinen Bindungsstelle (n=2 in Gleichung 11; "4-Parametermodell"; siehe auch B.5.). Die Bindungsparameter zur Charakterisierung der niederaffinen Bindungsstelle intakter Lymphozyten unterschieden sich nicht signifikant von den Parametern der niederaffinen Bindungsstelle auf Membranen (p>0.05 im t-Test; n=3 für die Versuche an Membranen, n=11 für die Versuche an intakten Lymphozyten; siehe auch B. 9.). Dabei betrug die Bindungsstellendichte (B_{max2}) 10360±4140 Bindungsstellen/Zelle und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_{D2}) 430±60 pmol/l. Dagegen war die Dichte hochaffiner Bindungsstellen auf intakten Zellen etwa doppelt so hoch wie auf Membranen (B_{max1} =1000±400 Bindungsstellen/Zelle auf intakten Lymphozyten; B_{max1} =550±190 Bindungsstellen/Zelle auf Membranen), während K_{D1} (Gleichgewichtsdissoziationskonstante hochaffiner Bindungsstellen) an intakten Zellen etwa die Hälfte des Werts betrug, der an Membranen meßbar war (K_{D1} =2.9±1.9 pmol/l in den Versuchen an intakten Lymphozyten (n=11); K_{D1} = 4.1±0.9 pmol/l in den Versuchen an Membranen (n=3))(5).

In Sättigungsexperimenten über einen weiten Konzentrationsbereich des Radioliganden, die in Anwesenheit von DTT durchgeführt wurden, wurde fast ausschließlich die hochaffine Bindungsstelle durch das Dithiol beeinflusst (Abb.14.).

In Sättigungsexperimenten über einen schmalen Konzentrationsbereich des Radioliganden (1.5 - 60 pmol/l), die hauptsächlich der Ermittlung der Bindungsparameter der für ¹²⁵JCYP hochaffinen Bin-

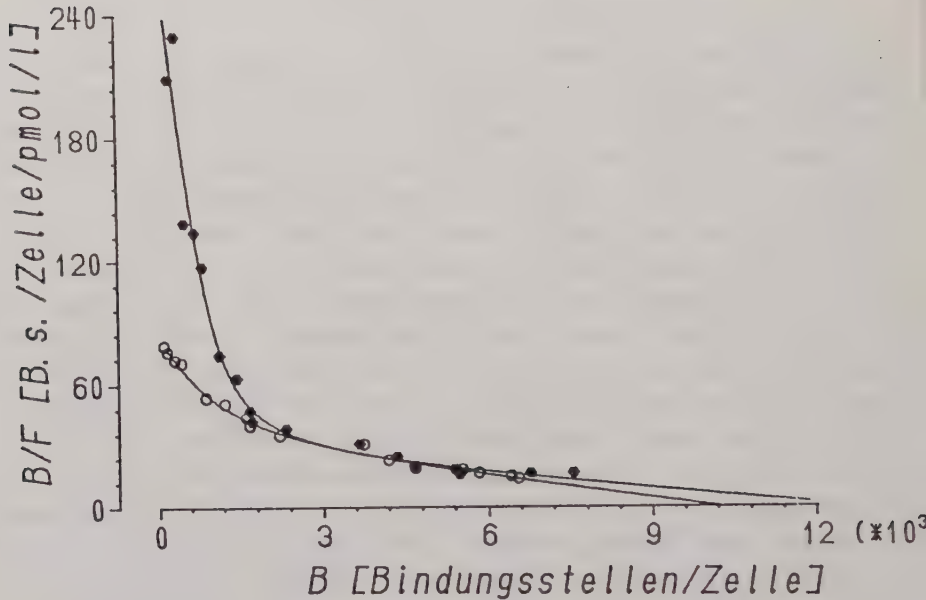


Abb.14. Einfluß von DTT auf Sättigungsexperimente mit $^{125}\text{JCYP}$ über einen weiten Konzentrationsbereich: Intakte Lymphozyten ($0.5 \cdot 10^6$ Zellen/500 μl) wurden in Anwesenheit von 10^{-3} mol/l DTT (o) und ohne DTT (•; Vergleich) mit 17 Konzentrationen $^{125}\text{JCYP}$ zwischen 1.5 und 600 pmol/l 120 Minuten lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die unspezifische Bindung des Radioliganden wurde in Gegenwart von 10^{-6} mol/l Timolol bestimmt. Die Inkubationen wurden durch rasche Filtration beendet (siehe auch B.5.). Die spezifische $^{125}\text{JCYP}$ -Bindung wurde nach Gleichung 11 für zwei voneinander unabhängige Klassen von Bindungsstellen ($n=2$) angepaßt. ($B_{\text{max}1}$ =Anzahl hochaffiner Bindungsstellen pro Zelle, K_{D1} =Gleichgewichtsdissoziationskonstante der hochaffinen Bindungsstelle; $B_{\text{max}2}$, K_{D2} : entsprechende Parameter der niederaffinen Bindungsstelle). Wie aus der abgebildeten graphischen Darstellung der Bindungsdaten nach Scatchard ersichtlich, beeinflusste DTT hauptsächlich den ersten, steilen Kurvenabschnitt, der die hochaffine Bindungsstelle repräsentiert. Bindungsparameter aus dem Vergleichsexperiment ohne DTT-Zusatz: $B_{\text{max}1}=940 \pm 150$ Bindungsstellen/Zelle; $K_{D1}=3.8 \pm 0.9$ pmol/l; $B_{\text{max}2}=11990 \pm 2440$ Bindungsstellen/Zelle; $K_{D2}=460 \pm 160$ pmol/l. Parameter aus dem Versuch in Anwesenheit von 10^{-3} mol/l DTT: $B_{\text{max}1}=830 \pm 440$ Bindungsstellen/Zelle; $K_{D1}=16.0 \pm 8.8$ pmol/l; $B_{\text{max}2}=9510 \pm 620$ Bindungsstellen/Zelle; $K_{D2}=310 \pm 80$ pmol/l.

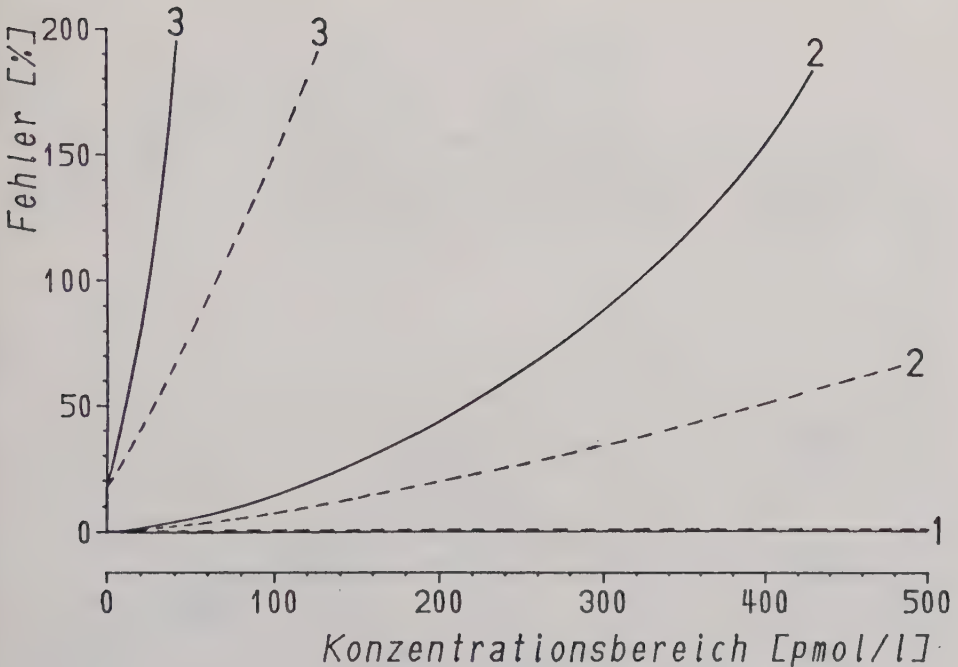


Abb.15. Vergleich verschiedener Anpassungsverfahren zur Ermittlung der Bindungsparameter der für $^{125}\text{JCYP}$ hochaffinen Bindungsstelle in Abhängigkeit des im Sättigungsexperiment verwendeten $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentrationsbereichs: Kurve 1 repräsentiert den Wert der Bindungsparameter K_D (—) und $B_{\max}$ (---) der hochaffinen Bindungsstelle im Modell zweier voneinander unabhängiger Klassen von Bindungsstellen ($n=2$ in Gleichung 11; 4-Parametermodell). Er läßt sich nur durch Anpassung von Bindungsdaten aus Sättigungsexperimenten über einen weiten Konzentrationsbereich des Radioliganden (1-600 pmol/l) mittels Gleichung 11 ($n=2$) genau ermitteln. Kurve 2 gibt den Fehler (prozentuale Abweichung vom Wert im 4-Parametermodell) bei der Anpassung an das vereinfachte Modell einer hochaffinen und einer nicht-sättigbaren niederaffinen Bindungsstelle (3-Parametermodell, Gleichung 12) in Abhängigkeit vom $^{125}\text{JCYP}$ -Meßbereich an. Er liegt in Konzentrationsbereichen von 1 bis 50-100 pmol/l $^{125}\text{JCYP}$ unter 10% und ist somit in diesem Meßbereich tolerabel. Anpassungen von Bindungsdaten aus Sättigungsexperimenten in einem so eingeschränkten Konzentrationsbereich nach Gleichung 11 liefern somit gute Schätzwerte der Parameter der hochaffinen Bindungsstelle. Die Anpassung an ein Modell einer einheitlichen Rezeptorpopulation ($n=1$ in Gleichung 11; Kurve 3) führt zu Fehlern von >19% und ist daher unzulässig.

Tab. 2.

	K_D [pmol/l]	B_{max} [B.s./Zelle]
● ohne DTT	2.7 ± 0.5	940 ± 100
○ 10^{-4} mol/l DTT	4.2 ± 0.9	1120 ± 170
▲ 10^{-3} mol/l DTT	4.6 ± 1.9	930 ± 280
◇ 10^{-2} mol/l DTT	18.3 ± 6.7	2460 ± 1050

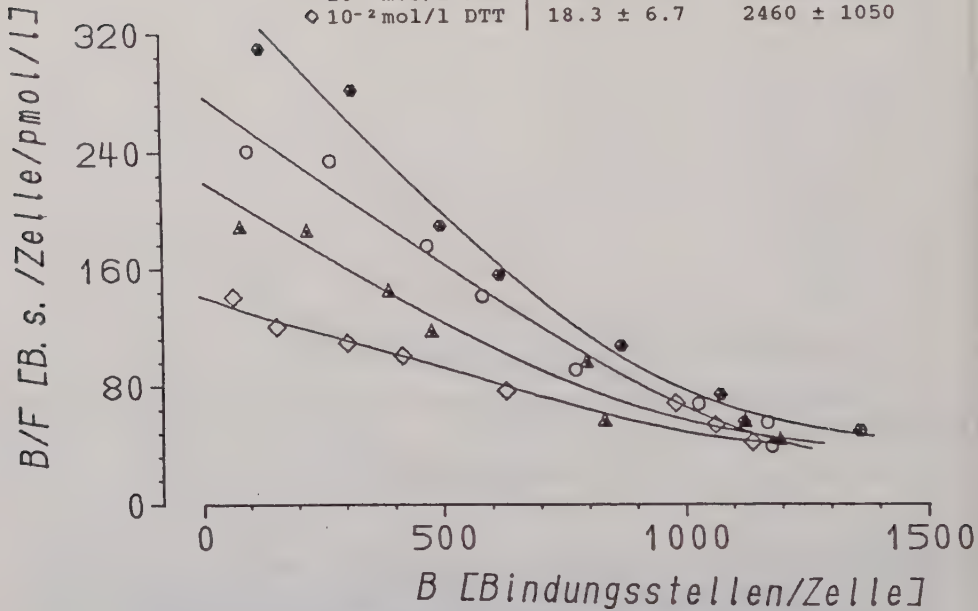


Abb.16. Einfluß von DTT auf die für 125 JCYP hochaffine Bindungsstelle in Sättigungsexperimenten an intakten Lymphozyten: Die Sättigungsexperimente wurden ohne DTT (●; Vergleich) und in Anwesenheit von drei Konzentrationen des Dithiols (○= 10^{-4} mol/l DTT; ▲= 10^{-3} mol/l DTT; ◇= 10^{-2} mol/l DTT) in einem eingeschränkten Konzentrationsbereich des Radioliganden (1.5-60 pmol/l 125 JCYP) wie in Abb.14. beschrieben durchgeführt und ausgewertet, wobei die Bindungsdaten nach Gleichung 12 angepaßt wurden. Die so berechneten Bindungsparameter der hochaffinen Bindungsstelle sind in Tab. 2. angegeben (K_D =Gleichgewichtsdissoziationskonstante; B_{max} =Anzahl hochaffiner Bindungsstellen pro Zelle). Gegenüber dem Vergleichsexperiment ohne DTT-Zusatz zeigen die Kurvenverläufe in Anwesenheit steigender DTT-Konzentrationen eine zunehmende Abflachung, d.h. eine Abnahme der Affinität der hochaffinen Bindungsstelle (entspricht einer Zunahme der K_D). Die Dichte hochaffiner Bindungsstellen (B_{max}) blieb dagegen weitgehend konstant (siehe Tab.2.).

Tab 3.

	K_D [pmol/l]	B_{max} [B.s./Zelle]
□ ohne DTT	4.9 ± 1.2	1460 ± 120
○ 10^{-5} mol/l DTT	4.4 ± 1.1	1310 ± 100
◆ 10^{-4} mol/l DTT	5.6 ± 1.1	1000 ± 60
▲ 10^{-3} mol/l DTT	4.9 ± 5.2	240 ± 80

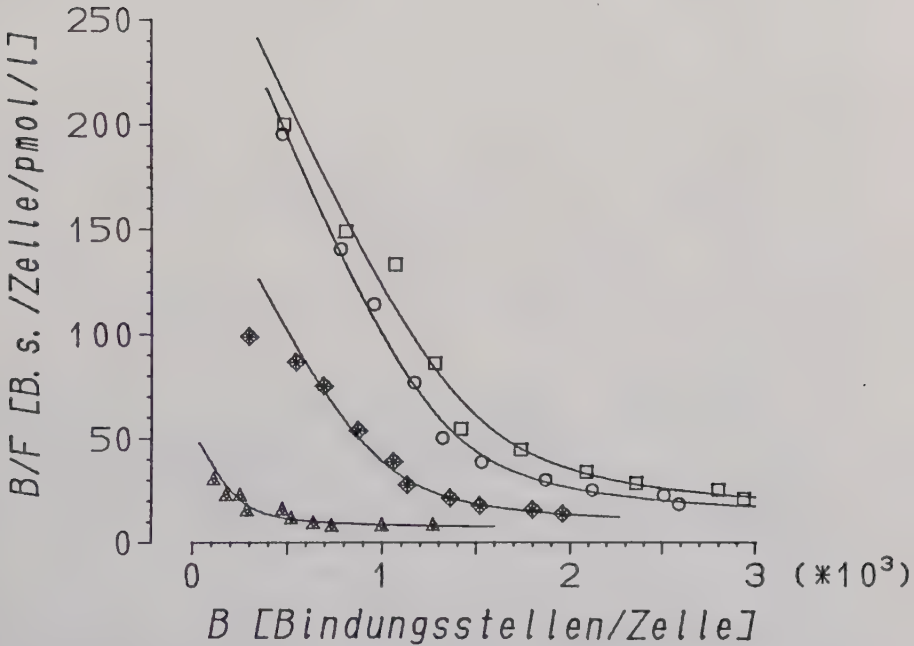


Abb.17. Einfluß von DTT auf die für 125 JCYP hochaffine Bindungsstelle in Sättigungsexperimenten an Membranen: Die Sättigungsexperimente wurden an Lymphozytenmembranen ($0.5 \cdot 10^6$ zerschlagene Zellen/500 μ l) wie in Abb. 16. beschrieben durchgeführt und ausgewertet (□=ohne DTT, Vergleich; ○= 10^{-5} mol/l DTT; ◆= 10^{-4} mol/l DTT; ▲= 10^{-3} mol/l DTT) Gegenüber dem Vergleichsexperiment ohne DTT-Zusatz zeigen die Kurvenverläufe in Anwesenheit steigender DTT-Konzentrationen eine zunehmende Parallelverschiebung nach links, d.h. eine Abnahme der Dichte hochaffiner Bindungsstellen (entspricht einer Abnahme der B_{max} ; siehe Tab. 3.). Die Affinität der verbleibenden hochaffinen Bindungsstellen blieb dagegen weitgehend konstant (siehe K_D in Tab.3.).

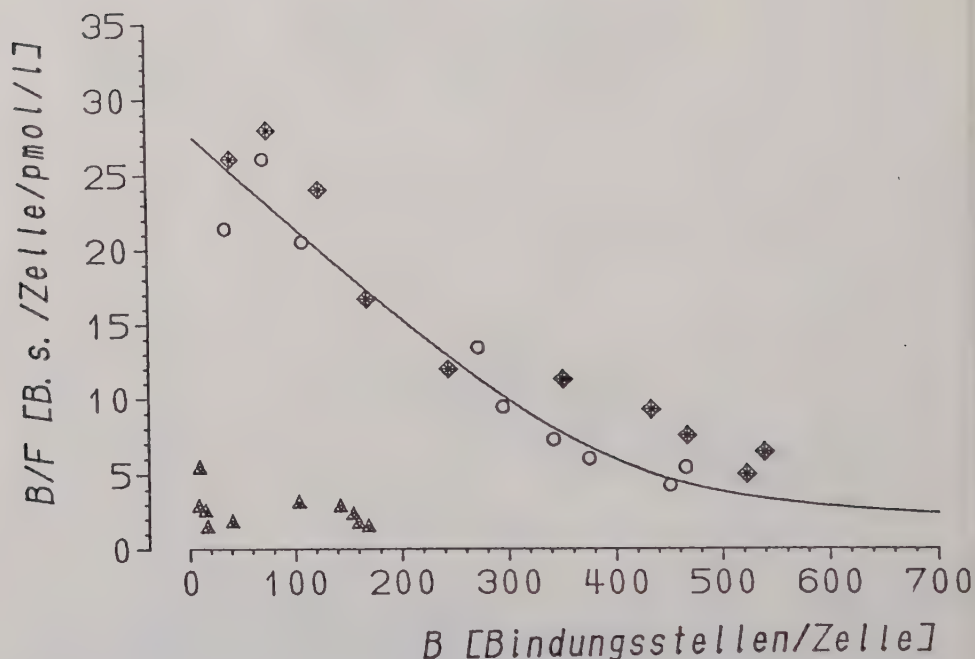


Abb. 18. Reversibilität des Effekts von DTT auf die für 125 ICYP hochaffine Bindungsstelle: Die Membransuspension eines Versuchstages wurde in drei Versuchsansätzen untersucht. Zwei Ansätze (o=ohne DTT (Vergleich); ▲=mit 10^{-2} mol/l DTT) dienten der Bestimmung des DTT-Effekts. Dazu wurden Sättigungsexperimente wie in Abb. 14. beschrieben durchgeführt. In einem dritten Versuchsansatz wurde die Suspension nach einer zwei stündigen Inkubation mit DTT (10^{-2} mol/l) zweimal mit Puffer gewaschen und dann weitere zwei Stunden an der Luft stehengelassen. Das anschließend durchgeführte Sättigungsexperiment (◆) ergab einen mit dem Vergleichsexperiment fast identischen Kurvenverlauf, der einer vollständigen Reversibilität des DTT-Effekts entspricht.

4. Einfluß von Dithiothreitol auf die Dissoziation von

(-)¹²⁵Jodocyanopindolol von menschlichen Lymphozyten

Die Dissoziation von ¹²⁵JCYP von intakten Lymphozyten sowie von Lymphozytenmembranen war biphasisch. Sie setzte sich zusammen aus der schnellen Dissoziation aus einem niederaffinen Bindungszustand des Radioliganden, die vor allem durch den ersten, steilen Abschnitt der Dissoziationskinetik (halblogarithmische Auftragung, siehe B.7) repräsentiert wird und der langsamen Dissoziation aus einem hochaffinen ¹²⁵JCYP-Bindungszustand, die vor allem durch den zweiten, flachen Abschnitt der Kinetik dargestellt wird. Eine gute Kurvenanpassung wurde erzielt für ein Modell zweier voneinander unabhängiger Klassen von Bindungsstellen (n=2 in Gleichung 18). Der prozentuale Anteil hochaffiner Bindung zu Beginn der Dissoziation, also nach Äquilibration bei einer bestimmten ¹²⁵JCYP-Konzentration ($B_{01}=53.7\%$ bei 29.1 pmol/l ¹²⁵JCYP in den Versuchen an intakten Zellen, $B_{01}=18.5\%$ bei 4.1 pmol/l ¹²⁵JCYP in den Versuchen an Membranen), war in guter Übereinstimmung mit dem aus den Sättigungsexperimenten abgeschätzten anteilmäßigen Besetzungszustand bei derselben ¹²⁵JCYP-Konzentration ($B_1=44.3\%$ bei 29.1 pmol/l ¹²⁵JCYP (intakte Zellen); $B_1=26.2\%$ bei 4.1 pmol/l ¹²⁵JCYP (Membranen)). Die prozentuale Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle (B_{02} in den Dissoziationskinetiken, bzw. B_2 in den Sättigungsexperimenten) verhielt sich dabei entsprechend der Beziehung $B_{01}+B_{02}=100\%$, bzw. $B_1+B_2=100\%$. An Membranen betrug die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der schnell dissoziierenden Komponente (k_{-2}) 0.063 min^{-1} (entspricht einer Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 11 Minuten), die der langsam dissoziierenden Komponente (k_{-1}) 0.001 min^{-1} ($t_{1/2}=690 \text{ min}$). k_{-2} von intakten Lymphozyten war identisch mit der k_{-2} von Membranen ($p>0.05$ im t-Test, siehe B.9.), während die Dissoziation von der hochaffinen Bindungsstelle auf Membranen etwa doppelt so schnell wie die Dissoziation von der hochaffinen Bindungsstelle intakter Zellen erfolgte (k_{-1} von intakten Lymphozyten = 0.0005 min^{-1} , $t_{1/2}=1390 \text{ min}$) (5).

In Dissoziationskinetiken, die in Anwesenheit von DTT durchgeführt wurden, kam es an Membranen sowie an intakten Lymphozyten fast ausschließlich zu einer Beeinflussung der für $^{125}\text{JCYP}$ hochaffinen Bindungsstelle (entspricht dem langsam dissoziierenden, flachen, zweiten Abschnitt der Kinetik). Dabei führten steigende DTT-Konzentrationen zu einer zunehmenden Erhöhung der Dissoziationsgeschwindigkeit des langsam dissoziierenden Anteils (entspricht einer Zunahme von k_{-1} , bzw. einer Zunahme der Neigung dieses Abschnitts). Die Dissoziationsgeschwindigkeit der hochaffinen Bindungsstelle näherte sich dabei in zunehmendem Maße der Kinetik der niederaffinen Bindungsstelle, die ihrerseits von dem Dithiol nicht beeinflusst wurde (K_{-2} und B_{02} wurden unter dem Einfluß von DTT nicht signifikant verändert; Abb.19. und Abb.20., Tab.4. und Tab.5.).

5. Einfluß von Dithiothreitol auf den intrazellulären

cAMP-Spiegel

Die intrazelluläre Konzentration des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) intakter Lymphozyten wurde nach 15-minütiger Inkubation der Zellen ohne Zusätze (basaler cAMP-Spiegel) und in Anwesenheit von 10^{-2}mol/l DTT bestimmt. Dabei bewirkte DTT einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration um das 0.6-fache des Basalwerts (von $5.4\text{ pmol cAMP}/10^6\text{ Zellen (basal)}$ auf $8.5\text{ pmol cAMP}/10^6\text{ Zellen (mit } 10^{-2}\text{mol/l DTT)}$). Dies entspricht etwa einem Drittel des maximalen durch Inkubation mit 10^{-4}mol/l Isoprenalin erreichbaren Anstiegs des intrazellulären cAMP-Spiegels (Anstieg um das 1.7 fache des Basalwerts auf $14.8\text{ pmol cAMP}/10^6\text{ Zellen}$). Siehe auch Abbildung 21..

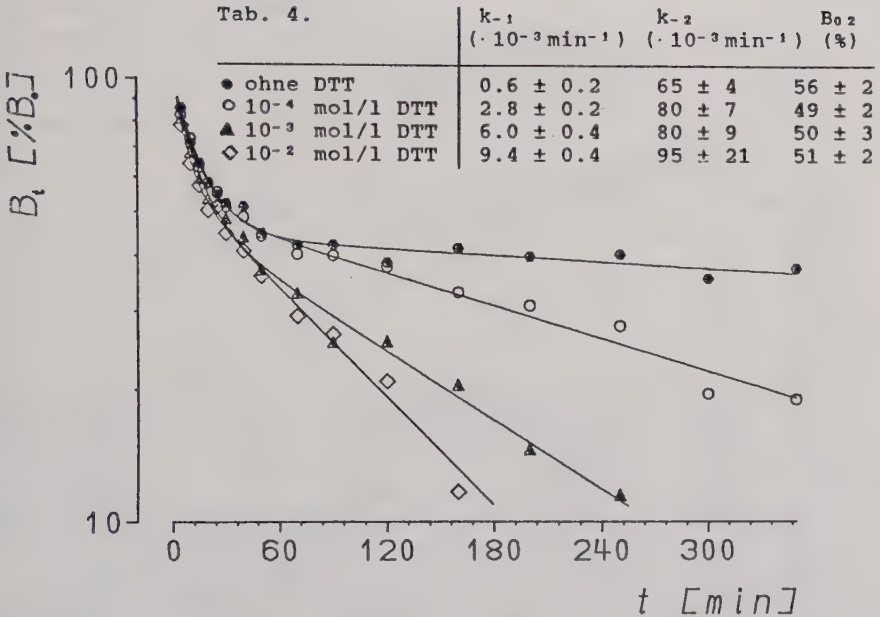


Abb.19. Dissoziationskinetik von $^{125}\text{JCYP}$ an intakten Lymphozyten und deren Beeinflussung durch DTT: Intakte Zellen ($0.5 \cdot 10^6$ Zellen/500 μl) wurden mit 29.1 pmol/l $^{125}\text{JCYP}$ äquilibriert (120 Minuten, 37°C). Zur Messung der Dissoziationsreaktion wurde die Assoziationsreaktion durch Zugabe von 10^{-6} mol/l Timolol ausgeschaltet und damit die Kinetik gestartet. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion durch rasche Filtration gestoppt und die noch zellgebundene Radioaktivität gemessen. Die nach Subtraktion der unspezifischen Bindung verbleibende spezifische Bindung zur Zeit t (B_t) wurde halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (prozentuale Auftragung bezogen auf die spezifische Bindung zu Beginn der Dissoziation $B_0=100\%$). Die Parameter des resultierenden biphasischen Kurvenverlaufs wurden nach Gleichung 18 berechnet (Tab. 4.: k_{-1} = Geschwindigkeitskonstante der langsam dissoziierenden hochaffinen Bindung des Radioliganden; B_{01} =Anteil hochaffiner Bindung zu Beginn der Kinetik; k_{-2} , B_{02} : entsprechende Parameter der niederaffinen $^{125}\text{JCYP}$ -Bindung; $B_{01}+B_{02}=100\%$). Die Versuche wurden ohne DTT (●=Vergleich) und in Anwesenheit von drei DTT-Konzentrationen (○= $10^{-4} \text{ mol/l DTT}$; ▲= $10^{-3} \text{ mol/l DTT}$; ◇= $10^{-2} \text{ mol/l DTT}$) durchgeführt. Steigende DTT-Konzentrationen bewirkten eine zunehmende Neigung des flachen, die langsam dissoziierende hochaffine Bindung darstellenden Kurvenabschnitts (Zunahme von k_{-1} , siehe Tab.4.). Er näherte sich in zunehmenden Maße der Kinetik der niederaffinen Bindung (steiler erster Kurvenabschnitt), die von dem Dithiol nicht beeinflusst wurde (k_{-2} und B_{02} blieben unverändert, siehe Tab.4.). Mittelwerte aus drei solchen Experimenten.

Tab. 5.

	k_1 ($\cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$)	k_2 ($\cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$)	$B_{0,2}$ (%)
○ ohne DTT	1.0 ± 0.1	59 ± 15	18 ± 2
▲ $10^{-4} \text{ mol/l DTT}$	1.8 ± 0.1	52 ± 9	21 ± 2
□ $10^{-3} \text{ mol/l DTT}$	6.0 ± 0.2	127 ± 67	8 ± 2
● $10^{-2} \text{ mol/l DTT}$	14.9 ± 0.5	siehe unten	

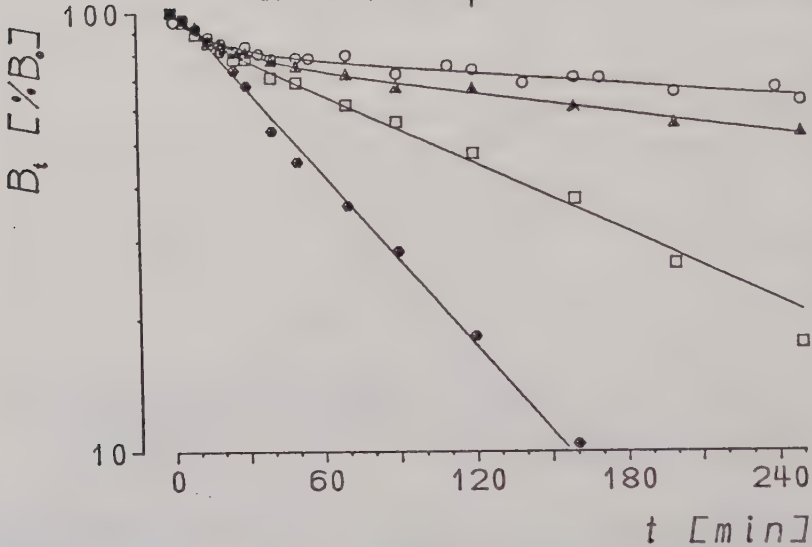


Abb.20. Dissoziationskinetik von $^{125}\text{JCYP}$ an Lymphozytenmembranen und deren Beeinflussung durch DTT: Die Versuche wurden wie in Abb. 19. beschrieben ohne DTT ($\circ$ =Vergleich) und in Anwesenheit von drei DTT-Konzentrationen ($\circ=10^{-4} \text{ mol/l DTT}$; $\circ=10^{-3} \text{ mol/l DTT}$; $\circ=10^{-2} \text{ mol/l DTT}$) durchgeführt und ausgewertet, wobei die Membranen ($0.5 \cdot 10^6$ zerschlagene Zellen/500 μl) mit $4.1 \text{ pmol/l } ^{125}\text{JCYP}$ äquilibriert wurden (120 Minuten, 37°C). Auch hier ergab sich ein biphasisches Dissoziationsverhalten des Radioliganden. Steigende DTT-Konzentrationen bewirkten wie in den Versuchen an intakten Zellen eine zunehmende Neigung des flachen, die langsam dissoziierende hochaffine Bindung darstellenden Kurvenabschnitts (Zunahme von k_1 , siehe Tab.5.). Er näherte sich auch hier in zunehmenden Maße der Kinetik der niederaffinen Bindung (steilerer erster Kurvenabschnitt), die von dem Dithiol nicht beeinflusst wurde (k_2 und $B_{0,2}$ blieben unverändert, Tab.5.). In den Versuchen mit $10^{-2} \text{ mol/l DTT}$ konnten die zwei Anteile der Kinetik nicht mehr voneinander unterschieden werden. Es konnte nur noch eine einzige Geschwindigkeitskonstante berechnet werden, die in Tab.5. unter k_1 angegeben ist. Mittelwerte aus drei solchen Experimenten.

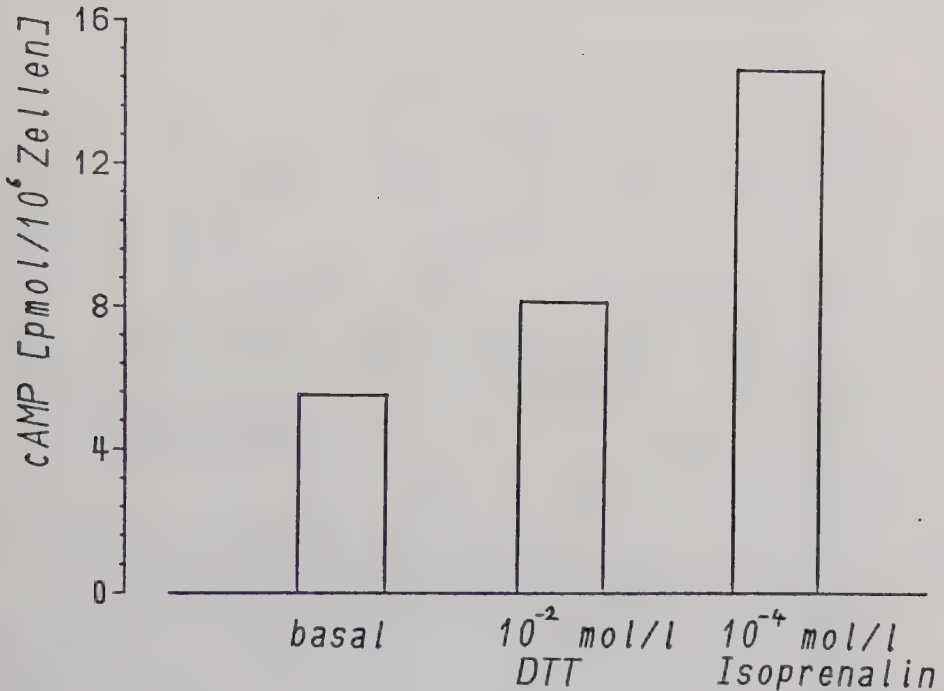


Abb.21. Einfluß von DTT auf den intrazellulären cAMP-Spiegel: Intakte Lymphozyten ($0.5 \cdot 10^6$ Zellen/Ansatz (500 μ l)) wurden in einem speziellen Puffer zur cAMP-Bestimmung (10^{-4} mol/l IBMX und 10^{-3} mol/l Ascorbinsäure; s.a. B.8.) 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10^{-2} mol/l DTT, bzw. 10^{-4} mol/l Isoprenalin wurden die Proben bei 37°C inkubiert (15 Minuten). Außerdem wurden zur Bestimmung des basal cAMP-Spiegels Proben ohne Zusätze inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zur Freisetzung des Zellinhalts aufgeköcht (5 Minuten, 100°C) und bei 15000 g zentrifugiert. Aus dem Überstand konnte dann mit einem RianenTM cAMP [¹²⁵J] RIA Kit die cAMP-Konzentration bestimmt werden: basaler cAMP-Spiegel=5.4 pmol/10⁶ Zellen; cAMP-Konzentration nach Inkubation mit 10^{-2} mol/l DTT: 8.5 pmol/10⁶ Zellen; nach Inkubation mit 10^{-4} mol/l Isoprenalin: 14.8 pmol/10⁶ Zellen. Mittelwerte aus drei solchen Versuchen.

D. DISKUSSION

1. Hoch- und niederaffine Bindungsstellen für (-)¹²⁵Jodocyano- pindolol auf menschlichen Lymphozyten

Sättigungsexperimente mit (-)¹²⁵Jodocyanopindolol (¹²⁵JCYP) über einen weiten Konzentrationsbereich (1.5 - 600 pmol/l) ergaben an intakten Lymphozyten sowie an Lymphozytenmembranen nicht-lineare Kurvenverläufe in der Auftragung nach Scatchard (63). Eine gute Kurvenanpassung wurde erreicht unter der Annahme von zwei sättigbaren Bindungsstellen für ¹²⁵JCYP, einer hoch- und einer niederaffinen Bindungsstelle. Die Dissoziation von ¹²⁵JCYP von intakten Zellen sowie von Membranen war biphasisch. Sie setzte sich zusammen aus der schnellen Dissoziation aus einem niederaffinen Bindungszustand des Radioliganden und der langsamen Dissoziation aus einem hochaffinen ¹²⁵JCYP-Bindungszustand. Die prozentuale Besetzung beider Komponenten zu Beginn der Dissoziation, also nach Äquilibrierung bei einer bestimmten ¹²⁵JCYP Konzentration, war in guter Übereinstimmung mit dem aus den Sättigungsexperimenten abgeschätzten anteilmäßigen Besetzungszustand bei derselben ¹²⁵JCYP Konzentration. Diese Ergebnisse belegen, wie bereits eingehend durch unsere Arbeitsgruppe untersucht, das Vorhandensein zweier voneinander unabhängiger Populationen von Bindungsstellen auf menschlichen Lymphozyten (5). Damit konnten erstmals in Bindungsstudien an β -Adrenozeptoren zwei Bindungsstellenklassen für den Antagonisten ¹²⁵JCYP nachgewiesen werden.

Eine Interpretation dieser Beobachtung läßt sich aus verschiedenen Studien über Agonisten- und Antagonisten-Bindung an β -Adrenozeptoren der letzten Jahre ableiten:

Wie bereits einleitend beschrieben (siehe Abaschnitt A.2.), sind im Verlauf der Informationsübertragung in die Zelle durch Agonisten mindestens zwei verschiedene Rezeptorzustände bekannt, nämlich der freie ("uncoupled") und der an das G_i-Protein gebundene ("coupled") Rezeptor (9). Für Agonisten sind auch zwei verschiedene Bindungszustände, eine hoch- und eine niederaffine Bindung

an den β -Adrenozeptor bekannt (20). Es konnte nachgewiesen werden, daß der für Agonisten hochaffine Rezeptorzustand den an das G_s -Protein gebundenen ("coupled") Rezeptorzustand darstellt. Der freie ("uncoupled") Rezeptor stellt dagegen einen niederaffinen Rezeptorbindungszustand dar (8,9,59,33).

Diese Arbeiten wurden größtenteils an S49 Lymphom Zellen durchgeführt, von denen zwei Varianten, nämlich eine G_s -Protein haltige Variante ("wild type S49 cells") und eine G_s -Protein freie Variante ("cyc- S49 cells") bekannt sind. Dabei wurde hochaffine Agonistenbindung nur an der G_s -Protein haltigen S49 Lymphomzellvariante ("wild type cells") beobachtet.

Hoch- und niederaffine Rezeptorzustände sind also bisher nur für die Agonistenbindung an β -Adrenozeptoren bekannt und erforscht. Aufgrund der Ergebnisse aus Bindungsstudien mit Antagonisten wurde dagegen bisher in den meisten Fällen eine einheitliche Population von Bindungsstellen vermutet. Diese Diskrepanz erklärt man sich aufgrund der Unterschiede in der Bindung von Agonisten und Antagonisten an β -Adrenozeptoren:

Der für die Agonistenbindung hochaffine Zustand ist relativ instabil. Er ließ sich nur durch Kurzzeitinkubation (1 min; (33)) oder durch Inkubation bei niedrigen Temperaturen (4 °C; (51)) erfassen. Längere Inkubationszeiten, bzw. höhere Inkubationstemperaturen, führten hingegen zu einem zunehmenden Anteil an niederaffiner Agonistenbindung (33,51,64). Thermodynamische Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen Agonisten und β -Adrenozeptoren ergaben eine Abnahme der freien Enthalpie bei der Agonistenbindung an den Rezeptor, was auf eine molekulare Veränderung des Rezeptors hinweist (20,71).

Dagegen ist die Antagonistenbindung an β -Adrenozeptoren stabil und lediglich entropiegetrieben. Sie gleicht der Wechselwirkung von Proteinen bei der keine Information übertragen wird (z.B. Interaktion von Antigen und Antikörper). Im Gegensatz zur Agonistenbindung konnten bei der Antagonistenbindung keine Änderungen der freien Enthalpie, die auf Veränderungen von Molekülstrukturen

hinweisen würden, festgestellt werden (20,71). Antagonisten sind also lediglich in der Lage verschiedene Bindungsstellen oder verschiedene Zustände von Bindungsstellen zu erkennen. Sie führen nicht zu molekularen Veränderungen am Rezeptor und nicht zur Informationsübertragung im Sinne einer Stimulierung der Adenylatzyklase.

Aus den eben beschriebenen Beobachtungen über Agonisten- und Antagonisten-Interaktion mit β -Adrenozeptoren läßt sich folgende Modellvorstellung ableiten:

Agonisten binden in einem mit Veränderungen von Molekülstrukturen einhergehenden Prozeß an β -Adrenozeptoren. Es kommt dabei zu einer durch die Agonistenbindung induzierten Kopplung des Rezeptors an das G_s -Protein, wodurch ein hochaffiner Rezeptorbindungszustand entsteht. [Einige Autoren bezeichnen diesen aus Ligand, Rezeptor und G-Protein bestehenden Zustand auch als "ternary complex" (2,22,32,59; siehe auch Abschnitt A.2.)]. Antagonisten sind dagegen nicht in der Lage Veränderungen auf molekularer Ebene herbeizuführen. Sie sind folglich auch nicht in der Lage eine Kopplung des Rezeptors an das G_s -Protein zu bewirken und so in der für die Agonistenbindung nachgewiesenen Art hochaffine Bindung selbst zu induzieren. Man nahm deshalb für Antagonisten eine einheitliche nicht G_s -Protein gekoppelte Klasse von Bindungsstellen an.

In einer kürzlich erschienen Arbeit (52) konnte allerdings erstmals nachgewiesen werden, daß bereits spontan bis zu 20% der β -Adrenozeptoren an das G_s -Protein gebunden sind, dh. in der für die hochaffine Agonistenbindung verantwortlichen Form vorliegen.

Wir konnten erstmals nachweisen, daß auch für den Antagonisten ¹²⁵I-CYP hoch- und niederaffine Bindungsstellen bestehen. Der Anteil der hochaffinen Bindungsstellen lag bei 5-15% der gesamten Bindungsstellen. Folglich könnte es sich dabei um präformierte an das G_s -Protein gebundene Rezeptoren handeln. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang die gute Übereinstimmung unserer Ergebnisse

mit jüngsten Untersuchungen von Sager und anderen (61), die in Sättigungsexperimenten an Lymphozyten mit einem anderen Radioliganden, nämlich ^3H -DHA, ebenfalls eine hoch- und eine niederaffine Bindungsstellenpopulation erhielten, wobei der Anteil hochaffiner Bindungsstellen ebenfalls etwa 10% der gesamten Bindungsstellen ausmachte.

Da nur G_s -Protein gekoppelte Rezeptoren die Adenylatzyklase zu stimulieren vermögen scheint diese hochaffine Antagonistenbindungsstelle also eine, bezüglich der Funktion des β -Adrenozeptors, sehr wichtige Bindungsstelle zu sein.

Die niederaffinen Bindungsstellen würden demnach entkoppelte Rezeptoren repräsentieren. Es könnte sich dabei um die sogenannte Rezeptorreserve ("spare receptors" (18)) handeln, also um einen Vorrat nicht aktiver Rezeptoren, die in einem durch die Zelle kontrollierten Prozeß in die aktivierte (G_s -Protein gekoppelte) Form überführt werden können.

Weitere Aufklärung bezüglich der biologischen Bedeutung der durch uns nachgewiesenen heterologen Bindungsstellenpopulation für den β -adrenergen Antagonisten ^{125}I -JCYP sollte die Untersuchung des Einflusses von Dithiothreitol und anderen Thiolen auf unsere Bindungsstudien erbringen.

2. Einfluß von Dithiothreitol und anderen Thiolen auf die Bindung von (-)- ^{125}I -Jodocyanopindolol an β -Adrenozeptoren auf Lymphozyten

Dithiothreitol (DTT, Clelands reagens) ist ein Disulfidbrücken spaltendes Agens (19). Es handelt sich um eine Redoxreaktion, wobei DTT als Reduktionsmittel wirkt, das Disulfidbrücken zu Sulfhydrylgruppen reduziert. Die Sulfhydrylgruppen des DTT werden dabei oxidiert.

In Dosis-Wirkungsbeziehungen kam es durch DTT in einer konzentrations- und zeitabhängigen Reaktion zu einer Abnahme der spezifischen ^{125}I -JCYP Bindung. Die konstitutionsanalogen (34) Dithiole L-, DL-Dithiothreitol und Dithioerythrol (Abb.7.) zeigten identi-

sche Wirkungen (ähnliche IC₅₀). Monothioglycerol und Mercaptoethanol, also Monothiole unterschiedlicher Molekülstruktur (Abb.7.), führten ebenfalls zum gleichen Effekt, jedoch in einem im Vergleich zu den Dithiolen etwa 50-fach höheren Konzentrationsbereich (Abb.8. und Abb.9.). Der Vergleich zwischen Membranen und intakten Zellen bezüglich der Wirksamkeit von Mono- bzw. Dithiolen ergab eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven an intakten Lymphozyten zu einem 20- bis 50-fach höheren Konzentrationsbereich (Abb.10. und Abb.11.).

Diese Ergebnisse zeigen, daß der beobachtete Effekt weitgehend unabhängig von der Molekülstruktur der verwendeten Thiole auftritt, daß andererseits aber die Anzahl der Sulfhydrylgruppen pro Molekül für dessen Wirkungsstärke entscheidend ist. Die stärkere Wirkung der Dithiole läßt sich durch ihre leichtere Oxidierbarkeit, bzw. ihre im Vergleich zu Monothiolen stärker reduzierende Wirkung erklären. Die verwendeten Dithiole besitzen nämlich im Gegensatz zu Monothiolen zwei oxidierbare Sulfhydrylgruppen pro Molekül und sind zudem durch Ringschlußbildung zu intramolekularer Oxidation befähigt (Abb.22).

Die stärkere Wirksamkeit der Thiole an den Membranpräparaten kann dadurch erklärt werden, daß für die ¹²⁵JCYP-Bindung wichtige Zellstrukturen beeinflußt werden, die in Präparationen intakter Zellen im Gegensatz zu den Membranpräparaten für die genannten Thiole nicht oder nur schlecht zugänglich sind (z.B. Strukturen an der Innenseite der Zellmembran, die im Zuge der Membranpräparation freigelegt werden).

In Sättigungsexperimenten (Abb.14.) sowie in Dissoziationskinetiken für ¹²⁵JCYP an menschlichen Lymphozyten wurde in Anwesenheit von DTT fast ausschließlich die hochaffine Bindungsstelle (entspricht dem langsam dissoziierenden Anteil) beeinflußt (Abb.19.; Abb.20.). Auf die niederaffine Bindungsstelle (entspricht dem schnell dissoziierenden Anteil) hatte DTT dagegen keinen Einfluß. Der in den Sättigungsexperimenten beobachtbare Effekt auf die

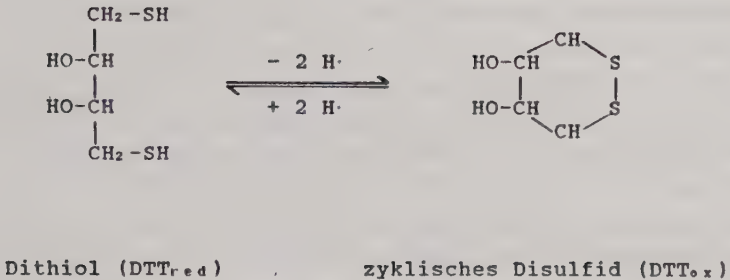


Abb. 22. Dithiothreitol (DTT, Clelands Reagens): Das Dithiol kann im Zuge einer Redoxreaktion durch intramolekulare Ring-schlußbildung zur zyklischen Disulfid-Form oxidiert werden. Das Redoxpotential dieser Reaktion beträgt 0.33 V (19).

hochaffine Bindungsstelle war durch einfaches Waschen und Stehen-lassen an der Luft vollständig reversibel (Abb. 18).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die für den Antagonisten ¹²⁵JCYP hochaffine Bindungsstelle über mindestens eine Disulfid-brücke verfügt, die durch DTT reduktiv gespalten werden kann. Dieser Vorgang ist durch Reoxidation an der Luft reversibel.

In den letzten Jahren untersuchten auch andere Arbeitsgruppen den Einfluß von Thiolen (DTT, Glutathion, Mercaptoethanol) auf Bin-dungsstudien mit radioaktiv markierten Antagonisten (³H-DHA, ¹²⁵JHYP) an β-Adrenozeptoren in Membranpräparationen verschiede-ner tierischer Gewebe (Truthahnerythrozyten (69), Herzmuskel- und Skelettmuskelzellen des Kaninchens (56, 74), C6-Gliomazellen der Ratte (47)). Sie fanden dabei ebenfalls Hinweise auf eine Disul-fidbrücke an der Bindungsstelle des β-Adrenozeptors für seine Li-ganden:

Behandlung mit Thiolen führte zu einer Abnahme der spezifischen Bindung des Radioliganden. Monothiole (Mercaptoethanol, Gluta-thion) wirkten wesentlich schwächer als das Dithiol DTT (56). Der durch DTT bewirkte Effekt war durch Behandlung mit verschiedenen Oxidationsmitteln (Luftexposition (47), H₂O₂ (74), o-Jodosoben-zoat (56)) ganz oder teilweise reversibel.

In allen diesen Untersuchungen ging man jedoch von einer einheitlichen Klasse von Antagonistenbindungsstellen aus. Manche Arbeiten berichten dabei von einer Abnahme der Affinität dieser Bindungsstelle gegenüber dem Radioliganden (47), andere von einer Abnahme der Dichte dieser Bindungsstelle (68,74), und wieder andere von einer gleichzeitigen Abnahme von Affinität und Dichte dieser Bindungsstelle (56) unter dem Einfluß von DTT.

Wir hingegen untersuchten den Einfluß von DTT auf beide durch uns nachgewiesenen Bindungsstellenklassen für den Antagonisten 125 JCYP auf intakten und zerschlagenen menschlichen Lymphozyten. Dabei wurde nur die hochaffine Bindungsstelle durch DTT beeinflusst. Es kam an intakten Zellen vor allem zu einer Affinitätsabnahme (Abb.16.), an Membranen vor allem zu einer Abnahme der Dichte hochaffiner Bindungsstellen (Abb.17.). Dieser Unterschied kann durch verschiedene GTP-Konzentrationen in beiden Präparationen erklärt werden (siehe unten).

Nun stellte sich uns die Frage nach der möglichen Bedeutung einer Disulfidbrücke an der hochaffinen Antagonistenbindungsstelle für die Funktion des β -Adrenozeptors. Dazu untersuchten wir das Verhalten des letzten Glieds der einleitend besprochenen Informationsübertragungskette ins Zellinnere (siehe Abschnitt A.2.), nämlich den intrazellulären cAMP-Spiegel, bezüglich seiner Beeinflussbarkeit durch DTT. 15 minütige Inkubation intakter Zellen mit 10^{-2} mol/l DTT führte zu einem Anstieg des basalen cAMP-Spiegels, der etwa einem Drittel des maximalen durch den Agonisten Isoproterenol erreichbaren cAMP-Anstiegs entsprach (C.5.; Abb.22). Dieses scheinbar erstaunliche Ergebnis ist im Zusammenhang mit verschiedenen Studien der letzten Zeit zu sehen:

Vauquelin et al. (69,70) zeigten, daß sowohl gebundene Antagonisten (Propanolol) als auch Agonisten (Adrenalin) in der Lage sind die Wirkung von DTT auf die spezifische Bindung des Radioliganden 3 H-DHA an β -Adrenozeptoren zu hemmen. Sie schlossen daraus auf die Lokalisation einer Disulfidbrücke an der Bindungsregion des

Rezeptorproteins für seine Liganden. Pederson und Ross (53) konnten kürzlich in Rekonstitutionsexperimenten an isolierten Rezeptor- und G-Proteinen (s.a. A.2.) nachweisen, daß das Disulfidbrücken spaltende DTT in der Lage ist β -Adrenozeptoren bezüglich ihrer Funktion zu aktivieren. Sie beobachteten nämlich in Anwesenheit von DTT eine Zunahme der Fähigkeit des G_s -Proteins GTP zu binden. Dieser Effekt trat nur in Anwesenheit des β -Adrenozeptors auf, mußte also auf einer Beeinflussung des Rezeptorproteins durch DTT beruhen, da DTT keinen Einfluß auf das G_s -Protein alleine hatte.

Unsere Untersuchungen gehen in dieser Frage nun noch einen Schritt weiter und zeigen, daß durch den DTT-Effekt auf β -Adrenozeptoren nicht nur eine Aktivierung des G_s -Proteins, sondern sogar ein Anstieg des basalen intrazellulären cAMP möglich ist. Im Gegensatz zu Pederson und Ross, die durch DTT eine Aktivitätssteigerung des G_s -Proteins in etwa der gleichen Höhe wie durch Agonisten erreichten, erreichten wir durch DTT nur etwa ein Drittel des maximal durch Agonisten induzierbaren cAMP Anstiegs. Dies kann durch Unterschiede in der Methodik erklärt werden.

Pederson und Ross arbeiteten an mittels chromatographischer und Filtrations-Methoden isolierten und gereinigten Rezeptor- und G-Proteinen, während wir intakte β -Adrenozeptoren tragende Zellen verwendeten. DTT führte in unseren Versuchen unter den zur Erlangung maximaler Effekte notwendigen Bedingungen (DTT-Konzentrationen $> 10^{-3}$ mol/l) zu einem mit steigenden DTT-Konzentrationen zunehmenden Vitalitätsverlust der Zellen (Methylenblauspeicherung; siehe auch C.2.). Möglicherweise sind also (nicht näher untersuchte) gleichzeitig ablaufende devitalisierende Effekte (z.B. Zerstörung von Enzymsystemen, Freisetzung von Nukleasen oder Esterasen) dafür verantwortlich, daß durch DTT kein maximaler cAMP-Anstieg, verglichen mit Agonisten, meßbar war. Eine andere Erklärung hierfür wäre eine im Vergleich zu Agonisten sehr geringe Affinität des Thiois gegenüber dem Disulfidbrücken tragenden Rezeptorareal in unserem System, weshalb in dem untersuchten

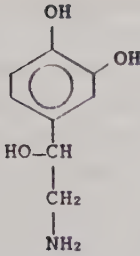
DTT-Konzentrationsbereich keine maximalen Effekte erreicht werden konnten.

In jedem Fall aber weisen unsere Ergebnisse zusammen mit den eben vorgestellten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen darauf hin, daß das β -Adrenozeptorprotein über mindestens eine für die Funktion des Rezeptors essentielle Disulfidbrücke verfügt. Die Spaltung dieser Disulfidbrücke durch DTT bewirkt eine Rezeptoraktivierung in ähnlicher Weise wie die Bindung eines Agonisten.

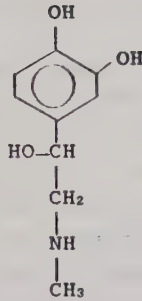
Dieser Befund muß nun bewertet werden hinsichtlich seiner Bedeutung für den Mechanismus der Rezeptoraktivierung durch Agonisten. Es stellt sich die Frage, ob Agonisten ebenso wie DTT in der Lage sind eine Disulfidbrücke am Rezeptorprotein zu spalten, um dieses so zu aktivieren. Dazu wiederum einige Betrachtungen zur Interaktion zwischen Agonisten und β -Adrenozeptoren:

Bezüglich der Informationsübertragung ins Zellinnere durch Agonisten ist bekannt, daß deren intrinsische Aktivität vor allem von der chemischen Struktur des aromatischen Rings und weniger von der Struktur der aliphatischen Seitenkette des Moleküls abhängt. Genauer gesagt ist die Fähigkeit als voller Agonist zu wirken gebunden an eine Substitution mit phenolischen OH-Gruppen in Position 3 und 4 des Aromaten (=Katecholstruktur (29,70)). Diese 3,4-Dihydroxyphenylalkanolamine, kurz Katecholamine, sind die Prototypen direkt wirkender β -Sympathomimetika wie Adrenalin, Noradrenalin, Isoproterenol oder Dopamin (29). Die ortho-Diphenol Gruppierung dieser Verbindungen kann durch Oxidation in eine ortho-Chinon Form umgewandelt werden (Abb.23.). Das Redoxpotential dieses Übergangs liegt bei 0.35 V (48). Es ist fast identisch mit dem Redoxpotential des Übergangs DTT_{ox}/DTT_{red} (0.33 V (19); siehe auch Abb.23).

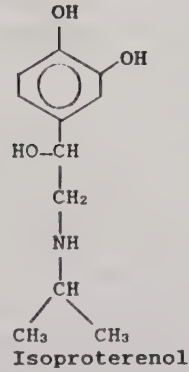
Antagonisten besitzen dagegen nicht die für die sympathomimetische Wirkung der Agonisten essentielle Katecholstruktur (29). Die



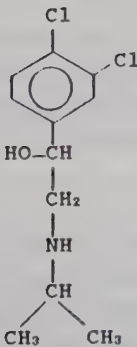
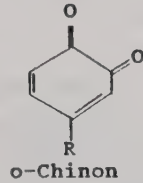
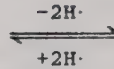
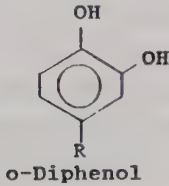
Noradrenalin



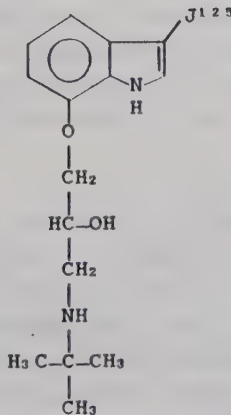
Adrenalin



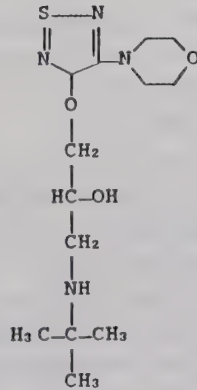
Isoproterenol



Dichlorisoproterenol (DCI)



1,2,3 JCYP



Timolol

Abb. 23 Struktur-Wirkungsbeziehung der Liganden des β -Adrenozeptors: Katecholamine (Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Isoproterenol) besitzen im Gegensatz zu den Antagonisten (DCI, JCYP, Timolol) oxidierbare phenolische OH-Gruppen. Das Redoxpotential des o-Diphenol/o-Chinon Übergangs beträgt 0.35 V (48).

für Agonisten beschriebene Redoxreaktion ist also bei Antagonisten nicht möglich.

Agonisten können folglich ebenso wie DTT, aber im Gegensatz zu Antagonisten, als Reduktionsmittel auftreten. Sie sind im Gegensatz zu Antagonisten in der Lage andere chemische Strukturen, wie z.B. Disulfidbrücken, durch Wasserstoffübertragung zu reduzieren.

Wie bereits unter D.1. beschrieben, binden Agonisten andererseits im Gegensatz zu Antagonisten in einem mit Veränderungen von Molekülstrukturen verbundenen Prozeß an β -Adrenozeptoren. In differenzierteren thermodynamischen Untersuchungen konnte sogar gezeigt werden, daß diese molekularen Veränderungen nicht oder nicht allein auf der Kopplung des Rezeptors an das G_s-Protein beruhen, sondern offensichtlich das Rezeptorprotein selbst betreffen (65). Es könnte sich dabei, wie aus dem vorher Gesagten hervorgeht, durchaus um die Spaltung einer Disulfidbrücke des Rezeptorproteins handeln.

Sowohl Agonisten als auch DTT vermögen also den β -Adrenozeptor bezüglich seiner Funktion zu aktivieren. Als gemeinsamer Mechanismus dieses Vorgangs kommt nicht nur für DTT, sondern auch für Agonisten, die Spaltung einer Disulfidbrücke am Rezeptorprotein in Betracht (ähnliches Redoxpotential, thermodynamische Untersuchungen).

Eine weitere Parallelität läßt sich aus dem Vergleich unserer Ergebnisse mit einer Arbeit von Aarons und anderen (1) ableiten. Sie untersuchten den Einfluß von Agonisten auf die Bindung des Antagonisten 125 I-JHYP an Lymphozytenmembranpräparationen. Dabei kam es durch Agonisten in Abwesenheit von GTP zu einer Abnahme der Dichte spezifischer 125 I-JHYP Bindungsstellen, in Anwesenheit von GTP dagegen zu einer Abnahme der Affinität der spezifischen Bindungsstellen des Radioliganden.

In ähnlicher Weise beeinflusste in unseren Versuchen DTT die spezifische 125 I-JCYP Bindung an hochaffine Bindungsstellen auf intakten Lymphozyten und Lymphozytenmembranen: An gewaschenen Membran-

nen, dh. in Abwesenheit von GTP, nahm die Bindungsstellendichte ab, während es an intakten Zellen, also in Anwesenheit von GTP, zu einer Abnahme der Affinität der spezifischen Bindungsstellen kam.

Zusammengenommen können jetzt die Ergebnisse zum Einfluß von DTT und anderen Thiolen auf unsere Bindungsstudien folgenderweise interpretiert werden: Die für $^{125}\text{JCYP}$ hochaffine Bindungsstelle besitzt mindestens eine Disulfidbrücke. Diese Disulfidbrücke(n) ist (sind) möglicherweise essentiell für die Funktion des β -Adrenozeptors. Sie kann durch DTT oder Agonisten gespalten werden, wodurch es zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels kommt.

Schließlich stellt sich noch die Frage nach der Bedeutung der für $^{125}\text{JCYP}$ niederaffinen Bindungsstelle. Wie aus dem ersten Diskussionsabschnitt hervorgeht könnte es sich dabei um entkoppelte β -Adrenozeptoren handeln. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit liefern unsere DTT-Versuche. In Dissoziationskinetiken näherte sich unter DTT-Einfluß die Dissoziationsgeschwindigkeit der hochaffinen Bindungsstelle mit steigender DTT-Konzentration in zunehmendem Maße der Kinetik der niederaffinen Bindungsstelle. Dies könnte bedeuten, daß DTT hochaffine in niederaffine Bindungsstellen überführt. Es würde sich dann bei den niederaffinen Bindungsstellen um Rezeptoren mit reduzierter Disulfidbrücke handeln. Folglich wäre aber in Sättigungsexperimenten unter DTT-Einfluß ein entsprechender Zuwachs an niederaffinen Bindungsstellen zu erwarten. Dies konnte allerdings, evtl. wegen des relativ kleinen Anteils hochaffiner Bindungsstellen (5-15 %) und aufgrund der Streuung der Bindungsparameter für die niederaffine Bindungsstelle, aus unseren Meßdaten nicht abgelesen werden.

Unsere DTT-Versuchsergebnisse liefern weitere Hinweise auf die funktionelle Bedeutsamkeit der hochaffinen $^{125}\text{JCYP}$ -Bindungsstelle auf Lymphozyten. Dies ist vor allem wichtig für die Bewertung von Bindungsstudien mit $^{125}\text{JCYP}$ an menschlichen Lymphozyten in ver-

schiedenen klinischen Studien. Die hochaffine Bindungsstelle für ^{125}I -JCYP scheint dabei also ein wichtiger Parameter für die Funktionslage des sympathikoadrenergen Systems zu sein. Eine eingehende Untersuchung der Primärreaktion bei der Ausbildung biologischer Effekte in diesem System, nämlich der Bindung β -adrenerger Agonisten an das Rezeptorprotein, stellt sich nun als Aufgabe für weitere experimentelle Untersuchungen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Durch unsere Arbeitsgruppe konnten erstmals in Bindungsstudien an β -Adrenozeptoren menschlicher Lymphozyten zwei Klassen voneinander unabhängiger Bindungsstellen, eine hoch- und einer niederaffine Bindungsstellenpopulation, für den Radioliganden $^{125}\text{JCYP}$ nachgewiesen werden. Aufgrund verschiedener Arbeiten über die Wechselwirkung von Agonisten und Antagonisten mit β -Adrenozeptoren könnte es sich bei den für $^{125}\text{JCYP}$ hochaffinen Bindungsstellen um präformierte, an das G_s -Protein gekoppelte und damit funktionell wichtige, Rezeptoren handeln. Die Untersuchung des Einflusses von Dithiothreitol (DTT) und anderen Thiolen auf unsere Bindungsstudien erbrachte ebenfalls Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung der hochaffinen $^{125}\text{JCYP}$ Bindungsstelle. Behandlung intakter Lymphozyten mit DTT führte zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. In Sättigungsexperimenten und Dissoziationskinetiken wurde in Anwesenheit von DTT fast ausschließlich die für $^{125}\text{JCYP}$ hochaffine Bindungsstelle beeinflusst. Sie besitzt demnach eine oder mehrere für die Funktion des Rezeptors essentielle Disulfidbrücke(n). Deren reduktive Spaltung ist durch DTT und durch Agonisten möglich und kommt als Mechanismus der Rezeptoraktivierung in Betracht. Die für $^{125}\text{JCYP}$ hochaffine Bindungsstelle auf Lymphozyten scheint deshalb als Funktionsparameter für klinische Studien geeignet zu sein. Die für $^{125}\text{JCYP}$ niederaffine Bindungsstellenklasse könnte aus entkoppelten β -Adrenozeptoren ("Rezeptorreserve"), bzw. aus Rezeptoren mit reduzierten Disulfidbrücken bestehen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. AARONS, R.D.; NIES, A.S.; GERBER, J.G.; MOLINOFF, P.B.:
Decreased Beta Adrenergic Receptor Density on Human
Lymphocytes after Chronic Treatment with Agonists.
J. Pharmacol. Exp. Therapeut. 224, 1-6 (1983)
2. ABRAMSON, S.N.; McGONIGLE, P.; MOLINOFF, P.B.:
Evaluation of Models for Analysis of Radioligand Binding Data
Mol. Pharmacol. 31, 103-111 (1987)
3. AHLQUIST, P.R.:
A Study of the Adrenotropic Receptors.
Amer. J. Physiol. 153, 586-600 (1948)
4. ALEXANDER, R.W.; DAVIS, J.; LEFKOWITZ, R.J.:
Direct Identification and Characterization of Beta-Adrenergic
Receptors in Rat Brain.
Nature 258, 437 (1975)
5. ANHÄUPL, T.; LIEBL, B.; REMIEN, J.:
Kinetic and Equilibrium Studies of ¹²⁵Iodocyanopindolol
Binding to β -Adrenoceptors on Human Lymphocytes: Evidence for
the Existence of Two Classes of Binding Sites.
J. of Rec. Res., in press
6. ATLAS, D.; STEER, M.L.; LEVITZKI, A.:
Stereospecific Binding of Propranolol and Catecholamines to
the Beta-Adrenergic Receptor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4246-4248 (1974)
7. AURBACH, G.D.; FEDAK, S.A.; WOODARD, C.,J.; PALMER, J.S.;
HAUSER, D.; TROXLER, F.:
The Beta-Adrenergic Receptor: Stereospecific Interaction of
an Iodinated Beta- Blocking Agent with a High Affinity Site.
Science 186, 1223-1224 (1974)
8. BIRD, S.J.; MAGUIRE, M.E.:
The Agonist-Specific Effect of Magnesium Ion on Binding by
Beta-Adrenergic Receptors in S49-Lymphoma cells. Interaction
of GTP and Magnesium in Adenylate Cyclase Activation.
J. Biol. Chem. 253, 8826-8834 (1978)
9. BIRNBAUMER, L.; MATTERA R., CODINA, J.; HILDEBRAND J.D.;
ROJAS, F.J.:
Regulation of Receptors and Adenyl Cyclase by N-Proteins.
in: Adrenergic Receptors: Molecular Properties and
Therapeutic Implications.
Symposium St.-Paul-de-Vence, France, October 21-24, 1984,
Schattauer Verlag, Symposia Medica Hoechst 19, 159-189 (1985)

10. BÖYUM, A.:
Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood.
Scand. J. Clin. Invest. 21 (Suppl. 97), 77-89 (1968)
11. BOKOCH, G.M.; SMIGEL, M.; HIGASHIJIMA, T.; GILMAN, A.G.:
Guanined Nucleotide Binding Regulatory Proteins as Information Transducers.
in: Adrenergic Receptors: Molecular Properties and Therapeutic Implications.
Symposium St.-Paul-de-Vence, France, October 21-24, 1984,
Schattauer Verlag, Symposia Medica Hoechst 19, 159-189 (1985)
12. BRODDE, O.E.:
Homogeneous of Beta-1-Adrenergic Receptors in Rat Kidney.
Biochem. Pharmacol. 31 (9), 1743-1747 (1983)
13. BRODDE, O.E.; ENGEL, G.; HOYER, D.; BOCK K.D.; WEBER, F.:
The β -Adrenergic Receptor in Human Lymphocytes:
Subclassification by the Use of a New Radioligand,
($\pm$)¹²⁵Iodocyanopindolol.
Life Sci. 11, 2189-2198 (1981)
14. BRUSCHI, G.; ORLANDINI, G.; PAVARANI, C.; SPAGGIARI, M.;
TACINELLI, L.; CAVATOFTA, A.:
Lymphocytic Beta-Adrenoceptor Abnormality in Primary Hypertension.
IRCS Med. Sci. 12, 461-462 (1984)
15. BUDDECKE, E.:
Grundriss der Biochemie
Walter de Gruyter Verlag, 1. Aufl., 7-9 (1970)
16. CERIONE, A.R.; CODINA, J.; BENOVIC, J.L.; LEFKOWITZ, R. J.;
BIRNBAUMER, L.; CARON, M.G.:
The Mammalian β_2 -Adrenergic Receptor: Reconstitution of Functional Interactions Between Pure Receptor and Pure Stimulatory Nucleotide Binding Proteins of the Adenylate Cyclase System.
Biochemistry 23, 4519-4525 (1984)
17. CLARK, B.J.; BERTHOLET, A.:
Effects of Pindolol on Vascular Smooth Muscle.
Gen. Pharmacol. 14, 117-119 (1983)
18. CLARK, R.B.:
Desensitization of Hormonal Stimuli Coupled to Regulation of Cyclic AMP Levels.
Adv. in Cyc. Nucl. and Prot. Phosph. Res. 20, 151-209 (1986)
19. CLELAND, W.W.:
Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH-Groups.
Biochemistry 3 (Suppl. 3), 480-482 (1963)

20. CONTRERAS, M.L.; WOLFE, B.B.; MOLINOFF, P.B.:
Thermodynamic Properties of Agonist Interactions with the
Beta Adrenergic Receptor-Coupled Adenylate Cyclase System.
I. High- and Low-Affinity States of Agonist Binding to
Membrane-Bound Beta Adrenergic Receptors.
J. Pharmacol. Exp.Therap., Vol.237 (Suppl.1), 154-164, (1986)
21. CONTRERAS, M.L.; WOLFE, B.B.; MOLINOFF, P.B.:
Thermodynamic Properties of Agonist Interactions with the
Beta Adrenergic Receptor-Coupled Adenylate Cyclase System.
II. Agonist Binding to Soluble Beta Adrenergic Receptors.
J. Pharmacol. Exp.Therap., Vol.237 (Suppl.1), 165-172, (1986)
22. DE LEAN, A.; STADEL, J.M.; LEFKOWITZ, R.J.:
A Ternary Complex Model Explains the Agonist-Specific Binding
Properties of the Adenylate Cyclase-Coupled β -Adrenergic
Receptor.
J. Biol. Chem. 255, 7108-7117 (1980)
23. DIXON, R.A.F.; KOBILKA, B.K.; STRADER, D.J.; BENOVIĆ, J.L.;
DOHLMAN, H.G.; FRIELLE, T.; BOLANOWSKI, M.A.; BENNETT, C.D.;
RANDS, E.; DIEHL, R.E.; MUMFORD, R.A.; SLATER, E.E.; SIGAL,
I.S.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J.; STRADER, C.D.:
Cloning of the Gene and cDNA for Mammalian β -Adrenergic
Receptor and Homology with Rhodopsin.
Nature 321, 75-79 (1986)
24. DULIS, B.V.; WILSON, I.B.:
The Beta- Adrenergic Receptor of Live Human Polymorphnuclear
Leucocytes.
J. Biol. Chem. 255 (3), 1043-1048 (1980)
25. EHRLICH, P.:
On Partial Functions of the Cell; Nobel lecture.
In the collected papers of P. Ehrlich, Vol. 3, 183
(F. Himmelweit, M. Marquart, and H. Dale, eds.).
Pergamon Press, Oxford (1956)
26. ENGEL, G.:
Identification of Different Subgroups of Beta Receptors by
means of Binding Studies in Guinea-Pig and Human Lung.
Tringle 19 (2), 69-76 (1980)
27. ENGEL, G.; HOYER, D.; BERTHOLD, R.; WAGNER, H.:
($\pm$)¹²⁵Iodocyanopindolol, a New Ligand for β -Adrenoceptors:
Identification and Quantification of Subclasses of
 β -Adrenoceptors in Guinea Pig.
Arch. Pharmacol. (Naunyn-Schmiedeberg's) 317, 277-285 (1981)
28. FITZGERALD, D.J.; DOYLE, V.; O'BRIAN, E.T.; KELLY, J.G.;
O'MALLEY, K.:
Beta-Adrenoceptor Density and Responsiveness in Borderline
Hypertension.
J. Hypertension 1 (Suppl. 2), 260-262 (1983)

29. FORTH, W.; HENSCHLER, D.; RUMMEL, W.:
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Bibliograph. Inst. Mannheim, 4. Aufl., 120-132 (1984)
30. GALANT, S.P.; UNDERWOOD, S.; DURISETI, L.; INSEL, P.A.:
Characterization of High Affinity Beta₂-Adrenergic Receptor
Binding of (-)[³H]Dihydroalprenolol to Human Polymorphnuclear
Cell Particulates.
J. Lab. Clin. Med. 92, 613-618 (1978)
31. GILMAN, A.G.:
G-Proteins and Dual Control of Adenylate Cyclase.
Cell 36, 577 (1984)
32. HEIDENREICH, K.A.; WEILAND, G.A.; MOLINOFF P.B.:
Characterization of Radiolabeled Agonist Binding to
β-Adrenergic Receptors in Mammalian Tissues.
J. Cyclic Nucleotide Res. 6, 217-230 (1980)
33. HOYER, D.; REYNOLDS, E.E.; MOLINOFF, P.B.:
Agonist-Induced Changes in the Peoperties of Beta-Adrenergic
Receptors on Intact S49 Lymphoma Cells.
Mol. Pharmacol. 25, 209-218 (1983)
34. KAUFMANN, H.:
Grundlagen der organischen Chemie.
UTB 1, Birkhäuser Verlag, 5. Aufl., 59-61 (1977)
35. KAUMANN, A.J.; BLANKS, J.R.:
β-Adrenoceptor Blocking Agents as Partial Agonists in
Isolated Heart Muscle: Dissociation of Stimulation and
Blockade.
Arch. Pharmacol. (Naunyn-Schmiedeberg's) 311, 237-248 (1980)
36. KAUMANN, A.J.; MORRIS, T.H.; BIRNBAUMER, L.:
A Comparison of the Influence of n-Isopropyl and n-tert. Butyl
Substituents on the Affinity of Ligand for Sinuatrial
β-Adrenoceptors in Rat Atria and β-Adrenoceptors Coupled to
the Adenylyl Cyclase in Kitten Ventricle.
Arch. Pharmacol. (Naunyn-Schmiedeberg's) 307, 1-8 (1979)
37. KRAWIETZ, W.; WERDAN, K.; SCHOBER, M.; ERDMANN, E.;
RINFLEISCH, G.E.; HANNING, K.:
Different Numbers of β-Receptors on Human Lymphocyte
Subpopulations.
Biochem. Pharmacol. 31, 133-136 (1985)
38. LANDMANN, R.; BITTIGER, H.; BÖHLER, F.R.:
High Affinity Beta-2-Adrenergic Receptors in Mononuclear
Leucocytes: Similar Density in Young and Old Normal Subjects.
Life Sci. 29, 1761-1771 (1981)

39. LANDMANN, R.; BÜRGISSE, E.; WESP, M.; BÖHLER, F.R.:
Betaadrenergic Receptors are Different in Subpopulations of
Human Circulating Lymphocytes.
J. Recept. Res. 4, 37-50 (1980)
40. LANDS, A.H.; ARNOLD, A.; MCAUCLIFF, J.P.; LUDENA, F.P.;
BROWN, T.G.:
Differentiation of Receptor Systems Activated by
Sympathomimetic Amines.
Nature 214, 597-598 (1967)
41. LANDS, A.H.; LUDENA, F.P.; BUZZO, H.J.:
Differentiation of Receptors Responsive to Isoproterenol.
Life Sci. 6, 2241-2249 (1967)
42. LANGLEY, J.N.:
On the Reaction of Cells and of Nerve Endings to Certain
Poisons, Chiefly as Regards the Reaction of Striated Muscle
to Nicotine and to Curare.
J. Physiol. 33, 374-413 (1906)
43. LANGLEY, J.N.:
On Nerve Endings and on Special Excitable Substances.
Proc. R. Soc. Lond. (Biol.) 78, 170-194
44. LANGLEY, J.N.:
On contraction of Muscle, Chiefly in Relation to the Presence
of "Receptive" Substances.
J. Physiol. 36, 347 (1907)
45. LEFKOWITZ, R.J.; MURKHERJEE, C.; COVERSTONE, M.; CARON, M.G.:
Stereospecific ^3H -(-)-Alprenolol Binding Sites,
Beta-Adrenergic Receptors and Adenylate Cyclase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 703-709 (1974)
46. LEVITZKI, A.; ATLAS, D.; STEER, M.L.:
The Binding Characteristics and Number of Beta-Adrenergic
Receptors on Turkey Erythrocyte.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2773-2776 (1974)
47. LUCAS, M.; HANOUNE, J.; BOCKAERT, J.:
Chemical Modification of the Beta-Adrenergic Receptors
Coupled with Adenylate Cyclase by Disulfide Bridge-Reducing
Agents.
Mol. Pharmacol. 14, 227-236 (1978)
48. MAHLER, H.R.; CORDES, E.H.:
Basic Biological Chemistry.
Harper and Row, N.Y. 24, 346 (1968)
49. MOLINOFF, B.; WOLFE, B.B.; WEILAND, G.A.:
Quantitative Analysis of Drug-Receptor Interactions:
II. Determination of the Properties of Receptor-Subtypes.
Life Sci. 29, 427-443 (1981)

50. MOLINOFF, B.; HOYER, D.; REYNOLD, E.E.:
Interactions of Agonists and Antagonists with β -Adrenergic Receptors on Intact S-49 Lymphoma Cells.
in: Catecholamines: Basic and peripheral Mechanisms, Alan R. Liss Inc. 150th Av. New York, 259-269 (1984)
51. MOTULSKY, H.J.; CUNNINGHAM, E.M.S.; DEBLASI, A.; INSEL, P.A.:
Desensitization and Redistribution of β -Adrenergic Receptors on Human Mononuclear Leukocytes.
Am. J. Physiol. 250 (Suppl. 5), 583-590 (1986)
52. NERME, V.; SEVERNE, Y.; ABRAHAMSSON, T.; VAUQUELIN, G.:
Spontaneous Coupling of the β -Adrenergic Receptor to N_s in Mammalian Cardiac Membranes.
Mol. Pharmacol. 30, 1-5 (1986)
53. FEDERSEN, S.E.; ROSS, E.M.:
Functional Activation of β -Adrenergic Receptors by Thiols in the Presence and Absence of Agonists.
J. Biol. Chem. 260 (26), 14150-14157 (1986)
54. POCHET, R.; DELESPESE, G.; GAUSSET, P.W.; COLLET, H.:
Distribution of Beta-Adrenergic Receptors on Human Lymphocyte Subpopulations.
Clin. Exp. Immunology 38, 578-584 (1979)
55. PORZIG, H.; BAER, M.; CHANTON, C.:
Properties of Beta-Adrenoceptor Sites in Metabolizing and Non-Metabolizing Rat Reticulocytes and in Resealed Reticulocyte Ghosts.
Arch. Pharmacol. (Naunyn-Schmiedeberg's) 317, 286-293 (1979)
56. PRIOR, T.I.; PATEL, V.; DRUMMOND, G.I.:
Inactivation of the β -Adrenergic Receptor in Cardiac Muscle by Dithiols.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 63 (8), 932-936 (1985)
57. REMIEN, J.:
 β -Adrenoceptor Recognition Sites in Living Lymphocytes: A Model for Receptor Properties in Human Disease?
Eur. J. of Respir. Dis. 65 (Suppl. 135), 208-214 (1984)
58. REPKE, H.; LIEBMANN, C.:
Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme.
Akademie-Verlag, Ost-Berlin, 1987
59. ROSS, E.M.; MAGUIRE, M.E.; STURGILL, T.W.; BILTONEN, R.L.; GILMAN, A.G.:
Relationship between the Beta-Adrenergic Receptor and Adenylate Cyclase. Studies of Ligand Binding and Enzymes Activity in Purified Membranes of S49 Lymphoma Cells.
J. Biol. Chem. 252, 5761-5775 (1977)

60. SACHS, L.:
Angewandte Stochastik.
Springer Verlag Berlin, 6. Aufl. (1984)
61. SAGER, G.; SANDNESS, D.; AAKESSON, I.; JACOBSEN, S.:
Effect of Serum, Alpha-1 Acid Glycoprotein, Lipoproteins and
Albumin on Human Mononuclear Leucocyte β -Adrenoceptors.
Acta Pharmacol. et Toxicol. 58, 193-203 (1986)
62. SCARPACE, P.J.; ABRASS, I.B.:
Thyroid Hormone Regulation of Rat Heart, Lymphocyte, and Lung
Beta-Adrenergic Receptors.
Endocrinology 108 (3), 1007-1011, (1981)
63. SCATCHARD, G.:
The Attraction of Proteins for Small Molecules and Ions.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672 (1949)
64. SEVERNE, Y.; COPPENS, D.; BOTTARI, S.; RIVIERE, S.; KRAM, R.;
VAUQUELIN, G.:
Influence of the Beta-Adrenergic Receptor Concentration on
Functional Coupling of the Adenylate Cyclase System.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (Suppl. 15); 4637-4641 (1984)
65. SEVERNE, Y.; KANAREK, L.; VAUQUELIN, G.:
Agonist-Mediated Conformational Changes of β -Adrenoceptors
Could Occur Independent of Functional Coupling to N_s .
Arch. Pharmacol. (Naunyn-Schmiedeberg's) 332, 247-252 (1986)
66. SPIEGEL, A.M.; BILEZIKIAN, J.P.; AURBACH, G.D.:
Increased Adrenergic Receptor Content in Membranes of Stress-
Induced Erythrocytes.
Clin. Res. 23, 390c (1975)
67. STADEL, J.M.; LEFKOWITZ, R.J.:
The Beta-Adrenergic Receptor: Ligand Binding Studies
Illuminate the Mechanisms of Receptor-Adenylate Cyclase.
in: Current Topics in Membranes and Transports, Vol. 18
Academic Press (1983)
68. STRAUSS, W.L.; VENTER, J.C.:
A Sulfhydryl Group of the Canine Cardiac Beta-Adrenergic
Receptor Observed in the Absence of Hormone.
Life Sciences 36, 1699-1706 (1985)
69. VAUQUELIN, G.; BOTTARI, S.; KANAREK, L.; STROSBURG, A.D.:
Evidence for Essential Disulfide Bonds in β_1 -Adrenergic
Receptors of Turkey Erythrocyte Membranes. Inactivation by
Dithiothreitol.
J. Biol. Chem. 254 (Suppl. 11), 4462-4469 (1979)

70. VAUQUELIN, G.; SEVERNE, Y.; BOTTARI, S.; ANDRE, C.:
Agonist-Mediated Conformational Modification of β -Adrenergic Receptors
in: Catecholamines: Basic and Peripheral Mechanisms.
Alan R. Liss Inc., New York, 271-278 (1984)
71. WEILAND, G.A.; MINNEMAN, K.P.; MOLINOFF, P.B.:
Fundamental Difference between the Molecular Interactions of Agonists and Antagonists with the β -Adrenergic Receptor.
Nature 281, 114-117 (1979)
72. WEILAND, G.A.; MOLINOFF, B.:
Quantitative Analysis of Drug-Receptor Interactions:
II. Determination of Kinetic and Equilibrium Properties.
Life Sci. 29, 427-443 (1981)
73. WILLIAMS, L.T.; SNYDERMAN, R.; LEFKOWITZ, R.J.:
Identification of Beta-Adrenergic Receptors in Human Lymphocytes by $(-)^3\text{H}$ -Alprenolol Binding.
J. Clin. Invest. 57, 149-155 (1976)
74. WRIGHT, M.; DRUMMOND, G.I.:
Inactivation of the β -Adrenergic Receptor in Skeletal Muscle by Dithiols.
Biochem. Pharmacol. 32 (Suppl. 3), 509-515 (1983)
75. YAMAOKA, K.; TANIGAWARA, Y.; NAKAGAWA, T.; UNO, T.:
A Pharmacokinetic Analysis Program (MULTI) for Microcomputer.
J. Pharm. Dyn. 4, 879-885 (1981)

DANKSAGUNG

Zu besonderem Dank bin ich verpflichtet:

Herrn Professor Dr. Jörg Remien, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, München, für die Überlassung des Themas, die fortlaufende Unterstützung, sowie für viele anregende und lehrreiche Diskussionen während der Durchführung der Versuche und der Abfassung meiner Dissertation.

Herrn Thomas Anhäupl, Abteilung für Anaesthesiologie und Intensivmedizin der Universitätsklinik Erlangen, mit dem ich einen Großteil der Versuche durchführte und auswertete.

Herrn Dr. Reinhard Naar, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, München, für die Erstellung von statistischen Programmen und seine unermüdliche Hilfe und Beratung bei den EDV Arbeiten.

Herrn Dr. Ekkehard Haen, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, München, für das kritische Durchlesen der vorliegenden Arbeit.

Frau Annegret Landrock, Frau Sybille Kirzinger, Frau Iris Reithmeier und Frau Christina Lemmermann für Rat und Beistand in labortechnischen Fragen.

Meinem Freund, Herrn Josef Folger, München, für die großzügige Überlassung eines IBM-PC's, der eine große Hilfe bei der Abfassung dieser Arbeit darstellte.

LEBENS LAUF

Ich, Bernhard Liebl, wurde am 10. Juni 1958 als erstes von fünf Kindern des Diplom-Physikers Dr. Helmut Liebl und seiner Frau Elfriede Liebl, geb. Sixt, in München geboren.

Meine Kindheit verbrachte ich mit meinen Eltern und Geschwistern von 1959 bis 1968 in den Vereinigten Staaten von Amerika. Dabei lebten wir von 1959 bis 1964 in Boston, Massachusetts, und von 1964 bis 1968 in Santa Barbara, California. Dort besuchte ich die amerikanische Grundschule (Goleta Union School District, Santa Barbara, California).

Seit der Rückkehr meiner Familie nach Deutschland im Jahre 1968 bin ich in 8057 Eching bei Freising, Hartstr. 17, wohnhaft. Von 1968 bis 1977 besuchte ich das Josef Hofmiller Gymnasium in Freising, wo ich im Juni 1977 das Abitur ablegte.

Vom Herbst 1977 bis zum Sommer 1980 studierte ich Pharmazie an der Universität München und absolvierte den ersten Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung im Herbst 1979. Zum Wintersemester 1980/81 begann ich das Medizinstudium an der Universität Regensburg. Nach der ärztlichen Vorprüfung im Sommer 1982 wechselte ich wieder an die Ludwig Maximilians Universität München. Nach dem ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung im August 1983 und dem zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung im August 1985 beendete ich das Studium mit dem dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung im November 1986. Die Approbation als Arzt wurde mir im Dezember 1986 erteilt.

